

**LECITHIN - CHOLESTERYL - ACYL - TRANSFERASE**

**L C A T**

**VOLKER HEINEMANN**

**1987**







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554629\\_0001](https://archive.org/details/IA41554629_0001)

Aus der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern  
der Universität München  
Vorstand: Prof.Dr.med.Paumgartner

Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase

LCAT

Untersuchungen zur Meßmethodik

Klinische Verlaufsbeobachtungen der LCAT-  
Aktivität im Rahmen medikamentöser und  
diätetischer Interventionen

Untersuchung von LCAT-Apolipoprotein-  
Interaktionen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Volker Heinemann

aus  
Grafrath

Jahr

1987

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter:** Prof. Dr. P. Schwandt

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. H. Holzgreve  
Prof. Dr. B. Scherer

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:** Priv.-Doz. Dr. P. Weisweiler

**Dekan:** Prof. Dr. W. Spann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 09. 07. 1987

| Inhaltsverzeichnis<br>=====                                          | Seite<br>----- |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1. Einführung                                                        | 8              |
| 2. Methodik                                                          | 13             |
| 2.1. Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensubstrat-Methode           | 13             |
| 2.1.1. Darstellung des Assays                                        | 13             |
| 2.1.2. Herstellung der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                | 14             |
| 2.2. Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsubstrat-Methode           | 14             |
| 2.2.1. Darstellung des Assays                                        | 15             |
| 2.2.2. Delipoproteinisierung der Serumprobe                          | 15             |
| 2.2.2.1. Lipoproteinpräzipitation                                    | 15             |
| 2.2.2.2. Präparative Ultrazentrifugation                             | 15             |
| 2.2.3. Herstellung der Dilinoleoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen    | 16             |
| 2.3. LCAT-Aktivitätsmessung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays       | 17             |
| 2.3.1. Darstellung des Radioisotopen-Assays                          | 17             |
| 2.3.2. Lipidextraktionsverfahren                                     | 17             |
| 2.3.3. Dünnschichtchromatographie                                    | 18             |
| 2.3.4. Digitonin-Fällungs-Methode                                    | 19             |
| 2.3.5. Reinigung des [3H]-Cholesterins                               | 19             |
| 2.4. LCAT-Enzym-Reinigung                                            | 20             |
| 2.5. Isolierung von Apolipoprotein A-I                               | 22             |
| 2.6. Fraktionierung von Apolipoprotein A-I mittels Umkehrphasen-HPLC | 22             |
| 2.7. Probanden und Aufbau der Ernährungs- und Medikamenten-Studien   | 23             |
| 2.7.1.1. Probanden und Aufbau der Ernährungsstudie                   | 23             |
| 2.7.1.2. Diätzusammensetzung                                         | 24             |
| 2.7.2. Patienten und Aufbau der Sitosterin-Studie                    | 24             |
| 2.7.3. Probanden zur Erhebung von Kontrollwerten                     | 25             |
| 2.7.4. Serumgewinnung                                                | 25             |
| 2.7.5. Analytische Methoden                                          | 26             |
| 2.7.6. Statistik                                                     | 26             |

|           |                                                                                                             |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.        | Ergebnisse                                                                                                  | 27 |
| <hr/>     |                                                                                                             |    |
| 3.1.      | Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensubstrat-Methode                                                       | 27 |
| 3.1.1.    | Vergleich der Sensitivität der enzymatischen Cholesterinbestimmungs-Methoden                                | 27 |
| 3.1.2.    | CHOD-Jodid-Methode: Sensitivitätssteigerung durch Modifikation des Probe/Reagenz-Quotienten                 | 28 |
| 3.1.3.    | Zuverlässigkeit der enzymatischen Cholesterinbestimmung mit Hilfe der CHOD-Jodid-Methode                    | 29 |
| 3.1.4.    | Zuverlässigkeit der enzymatischen LCAT-Aktivitätsmessung                                                    | 29 |
| 3.1.5.    | 2-Mercaptoäthanol: Inhibitorische Wirkung auf die Farbreaktion bei der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung | 30 |
| 3.1.6.    | Stabilität der LCAT-Enzymaktivität                                                                          | 31 |
| 3.1.7.    | Inhibition der LCAT-Reaktion durch das Farbreagenz des CHOD-Jodid Kits                                      | 32 |
| 3.1.8.    | Temperaturabhängigkeit der LCAT-Reaktion                                                                    | 33 |
| 3.1.9.    | Einfluß des pH auf die LCAT-Aktivität                                                                       | 33 |
| 3.1.10.   | Eigenschaften der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                                                            | 34 |
| 3.1.10.1. | Metastabilität der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                                                           | 34 |
| 3.1.10.2. | Einfluß der Metastabilität der Liposomen auf die LCAT-Aktivierung                                           | 35 |
| 3.1.10.3. | Reproduzierbarkeit der LCAT-Aktivierung durch Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                                | 35 |
| 3.1.10.4. | Einfluß der Beschallungsdauer auf die Qualität der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                           | 36 |
| 3.1.11.   | Funktion der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen im LCAT-Assay                                                   | 37 |

|           |                                                                                                                                                       |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.11.1. | LCAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentration                                                                             | 37 |
| 3.1.11.2. | Linearitätssdauer der LCAT-Reaktion ohne Stimulation durch Dipalmitoyl-Lecithin                                                                       | 38 |
| 3.1.11.3. | Linearitätsverlängerung der initialen LCAT-Reaktion bei Stimulation durch Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen                                              | 38 |
| 3.1.11.4. | Phasenspezifität der LCAT-Aktivierung durch Dipalmitoyl-Lecithin                                                                                      | 40 |
| 3.1.11.5. | Vergleich der LCAT-Aktivität in Lecithin-stimulierten und nicht-stimulierten Serumproben                                                              | 42 |
| 3.1.12.   | Substrateigenschaften des hitzeinaktivierten Serums in der LCAT-Reaktion                                                                              | 46 |
| 3.1.13.   | LCAT-Normwerte bei Normalprobanden                                                                                                                    | 47 |
| 3.2.      | Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsubstrat-Methode                                                                                                 | 47 |
| 3.2.1.    | Präzision der LCAT-Aktivitätsbestimmung im Überstand nach Lipoproteinpräzipitation                                                                    | 47 |
| 3.2.2.    | Apolipoprotein A-I Konzentration im Fällungs-Überstand nach Lipoproteinpräzipitation                                                                  | 49 |
| 3.2.3.    | Cholesterin-Konzentration bei Liposomen, die aus Dilineoyl-Lecithin und Cholesterin bei steigendem Lecithin/Cholesterin-Quotienten hergestellt wurden | 50 |
| 3.2.4.    | LCAT-Aktivität im Fällungsüberstand in Abhängigkeit von der Lecithin -bzw. der Cholesterin-Konzentration                                              | 51 |
| 3.2.5.    | Optimales Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Verhältnis                                                                                                   | 52 |
| 3.2.6.    | Linearität der initialen Veresterungsaktivität im Überstand nach Lipoproteinfällung                                                                   | 52 |
| 3.2.7.    | Aktivitätsverlust der LCAT nach Lipoproteinfällung                                                                                                    | 54 |

|           |                                                                                                                      |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.8.    | Einfluß der Magnesiumchlorid-Konzentration auf die LCAT-Aktivität                                                    | 55 |
| 3.2.9.    | Einfluß der Natriumphosphorwolframat-Konzentration auf die LCAT-Aktivität                                            | 55 |
| 3.2.10.   | Einfluß von Natriumcitrat auf die LCAT-Aktivität                                                                     | 56 |
| 3.2.11.   | Einfluß von Natriumcitrat, Magnesiumchlorid und Natriumphosphorwolframat auf die enzymatische Cholesterinbestimmung  | 56 |
| 3.2.12.   | LCAT-Aktivität in der $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion                                                             | 58 |
| 3.2.12.1. | Charakterisierung der $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion                                                             | 58 |
| 3.2.12.2. | Charakterisierung der $d < 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion                                                             | 58 |
| 3.2.12.3. | Apolipoprotein A-I Konzentration in den Fraktionen $d < 1,210 \text{ g/ml}$ und $d > 1,210 \text{ g/ml}$             | 59 |
| 3.2.12.4. | LCAT-Aktivität bei HDL-Zugabe zu der $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion                                              | 59 |
| 3.2.12.5. | Optimales Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Verhältnis für den LCAT-Assay in der $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion     | 60 |
| 3.3.      | LCAT-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays                                                         | 61 |
| 3.3.1.    | Präzision des Radioisotopen-Assays                                                                                   | 61 |
| 3.3.2.    | Vergleich der Digitonin-Fällungsmethode mit der chromatographischen Trennung der Lipidfraktionen                     | 61 |
| 3.4.      | Untersuchung des Effektes von Apolipoprotein A-I sowie von Apolipoprotein A-I - Subfraktionen auf die LCAT-Aktivität | 62 |
| 3.4.1     | Apolipoprotein A-I Konzentrationen bei der LCAT-Enzym-Reinigung                                                      | 62 |
| 3.4.2.    | LCAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Apolipoprotein A-I Konzentration                                              | 62 |
| 3.4.3.    | Isolierung von Apolipoprotein A-I - Subfraktionen mittels der Umkehrphasen-HPLC                                      | 64 |
| 3.4.4.    | Kofaktoreigenschaften von Apolipoprotein A-I Subfraktionen bei der LCAT-Reaktion                                     | 64 |

|        |                                                                                                                |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.   | Ernährungsstudien                                                                                              | 66 |
| 3.5.1. | Ergebnisse der Diätgruppe IFK<br>(3 Monate fettmodifizierte Diät, daraufhin<br>weitere 3 Monate Kontrollldiät) | 66 |
| 3.5.2. | Ergebnisse der Diätgruppe IKF<br>(3 Monate Kontrollldiät, daraufhin weitere<br>3 Monate fettmodifizierte Diät) | 66 |
| 3.5.3. | Ergebnisse der Diätgruppe II<br>(3 Monate fettmodifizierte Diät, daraufhin<br>3 weitere Monate Kontrollldiät)  | 67 |
| 3.5.4. | Vergleich der Resultate nach dreimonatiger<br>Kontrollldiät in den drei Probandengruppen                       | 68 |
| 3.6.   | Ergebnisse der Sitosterin-Studie                                                                               | 69 |
| 3.7.   | Vergleich der LCAT-Aktivität bei männlichen<br>und weiblichen normolipidämischen Probanden                     | 70 |
| 3.8.   | LCAT-Aktivität bei Hyperlipoproteinämie Typ<br>IIa -Patienten                                                  | 70 |
| 4.     | Diskussion                                                                                                     | 71 |
| -----  |                                                                                                                |    |
| 4.1.   | Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensub-<br>strat-Methode                                                     | 71 |
| 4.1.1. | Methodenvergleich                                                                                              | 71 |
| 4.1.2. | Die enzymatische Cholesterin-Bestimmung<br>im LCAT-Assay                                                       | 72 |
| 4.1.3. | Definition der Dipalmitoyl-Lecithin-Lipo-<br>somen                                                             | 74 |
| 4.1.4. | Funktion der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposo-<br>men im LCAT-Assay                                                 | 74 |
| 4.1.5. | Vergleich der LCAT-Aktivität in Dipalmi-<br>toyl-Lecithin stimulierten und nicht-sti-<br>mulierten Serumproben | 76 |
| 4.1.6. | Normwerte der LCAT-Aktivitätsmessung nach<br>Akanuma                                                           | 76 |

|        |                                                                                                            |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.7. | Charakterisierung des LCAT-Enzyms im enzymatischen LCAT-Assay                                              | 77 |
| 4.2.   | Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsubstrat-Methode                                                      | 78 |
| 4.2.1. | Standardisierung des LCAT-Substrates in der Fremdsubstrat-Methode                                          | 78 |
| 4.2.2. | Definition der delipoproteinisierten Serumfraktion                                                         | 78 |
| 4.2.3. | Interferenz der Lipoproteinfällung mit dem enzymatischen LCAT-Assay                                        | 79 |
| 4.2.4. | Dilinooyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen als standardisierbares Substrat der LCAT                          | 80 |
| 4.2.5. | Beurteilung und Indikation der Fremdsubstrat-Methode nach Bartholomé                                       | 82 |
| 4.2.6. | LCAT-Aktivität in der d>1,210g/ml-Fraktion                                                                 | 82 |
| 4.3.   | Die LCAT-Aktivitätsmessung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays; Indikation und Methodenvergleich            | 84 |
| 4.4.   | Reinigung des LCAT-Enzyms                                                                                  | 85 |
| 4.5.   | Untersuchung der Kofaktor-Eigenschaften von Apolipoprotein A-I Isoformen bei der LCAT-LCAT-Reaktion        | 86 |
| 4.6.   | Ernährungsstudien                                                                                          | 88 |
| 4.6.1. | Begründung der Diätmodifikation und des Studienaufbaus                                                     | 88 |
| 4.6.2. | Diskussion der Ernährungsstudien                                                                           | 90 |
| 4.6.3. | Kinetik der Veränderungen von Lipid- und Lipoproteinparametern sowie der LCAT im Verlauf der Diätstudie II | 94 |
| 4.6.4. | Die Bedeutung der Kontrolldiät bei der Beurteilung diätetischer Interventionen                             | 94 |
| 4.7.   | Effekt einer $\beta$ -Sitosterin-Therapie auf die LCAT-Aktivität bei der Hyperlipoproteinämie Typ IIa      | 95 |

|        |                                                                                         |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.8.   | Vergleich der LCAT-Aktivität bei männlichen und weiblichen normolipidämischen Probanden | 98  |
| 4.9.   | LCAT-Aktivität bei Hyperlipoproteinämie Typ IIa                                         | 98  |
| 5.     | Zusammenfassung                                                                         | 100 |
| 6.     | Anhang                                                                                  | 101 |
| 6.1.   | Tabellen und Abbildungen                                                                | 101 |
| 6.1.1. | Tabellen                                                                                | 101 |
| 6.1.2. | Abbildungen                                                                             | 113 |
| 6.2.   | Literaturverzeichnis                                                                    | 120 |
| 6.2.1. | Fremdliteratur                                                                          | 120 |
| 6.2.2. | Eigene Publikationen                                                                    | 141 |
| 6.3.   | Danksagung                                                                              | 142 |
| 6.4.   | Lebenslauf                                                                              | 143 |

## 1. Einführung

=====

Das Enzym Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase (LCAT) katalysiert die Veresterung von freiem Cholesterin (UC) im Serum. Im Rahmen der LCAT-Reaktion wird eine meist ungesättigte Fettsäure aus der C-2 Position von Phosphatidylcholin (Lecithin) auf freies Cholesterin transferiert (12,51, 133). Als Produkte dieser Veresterungsreaktion werden Cholesterin-ester und Lysophosphatidylcholin gefunden (Abbildung 1). Die Zunahme von verestertem Cholesterin nach Seruminkubation bei 37°C wurde erstmals 1935 von Sperry (138) beschrieben.

Die Lecithin-Cholesteryl-Acyltransferase, die beim Menschen sowohl im Blut als auch in der Lymphe nachweisbar ist, wird in der Leber synthetisiert (111,132) und ist verantwortlich für den weitaus Überwiegenden Teil des im Serum veresterten Cholesterins (109). Die Aktivität des LCAT-Enzyms wird reguliert sowohl durch die Lipidkomposition i.S. der Substrat-Produkt-Regulation als auch durch die Interaktion mit Lipoproteinen und Apolipoproteinen. Kofaktoren des LCAT-Enzyms sind die Apolipoproteine A-I und C-I (3,168). Bei Fehlen dieser Kofaktoren kommt die Veresterungsreaktion "in vitro" vollständig zum Erliegen (7,8,50,104,137). Die Cholesterin-veresterung durch die LCAT findet in enger Beziehung zu den HDL statt (2,41,63,107,115). Das der LCAT-Reaktion zur Verfügung stehende HDL-Cholesterin entstammt sowohl dem VLDL- und Chylomikronen-Katabolismus als auch dem Gewebe-Cholesterin-Pool (65, 145).

Die LCAT ist in den Triglyzerid-Metabolismus integriert (40, 66, 92,93, 128, 135) einerseits indem sie das im Rahmen des Chylomikronen- und -VLDL-Katabolismus anfallende freie Cholesterin der Oberflächen-Remnants verestert, andererseits indem sie möglicherweise parallel mit den VLDL von der Leber synthetisiert wird (108). In diesem Sinne wurde bei erhöhtem Triglyzerid-Umsatz auch eine erhöhte LCAT-Aktivität gefunden (66, 134,140). Über die Verbindung von Triglyzerid und Cholesterin-Metabolismus stellt sich die LCAT als Schlüsselenzym des Lipidmetabolismus dar. Die konkrete pathophysiologische Funktion der LCAT ist jedoch immer noch weitgehend hypothetisch.

Möglicherweise erleichtert die LCAT-Reaktion die Aufnahme von Membran-Cholesterin durch die HDL und ist so mitverantwortlich für den Nettotransport von Cholesterin aus dem Gewebe-Cholesterin-Pool (19,65,66,119). Bei erhöhtem Cholesterin-Umsatz wurde auch die LCAT-bedingte Cholesterin-Veresterung im Serum gesteigert gefunden (134). Bei Herzinfarktpatienten dagegen wurden erniedrigte HDL-Konzentrationen (6) sowie erniedrigte LCAT-Aktivitätswerte im Sinne

eines verminderten Cholesterin-Umsatzes nachgewiesen (9). Das familiäre LCAT-Enzym-Mangel-Syndrom ist gekennzeichnet durch hohe Serumkonzentrationen an Phosphatidylcholin und unverestertem Cholesterin sowie durch erhebliche kompositionelle Veränderungen in allen Lipoprotein-Fraktionen (10, 54, 58, 70, 90). Klinisch äußert sich die verminderte Cholesterin-Veresterung in früh einsetzender Atherosklerose sowie den Symptomen von Zellmembranveränderungen und pathologischer Lipidspeicherung.

Die offensichtlich zentrale Stellung der LCAT im Lipidstoffwechsel führt zu dem Fragekomplex der Enzym-Regulation. In wie weit können die im Serum meßbaren Lipid- und Lipoproteinkonzentrationen als regulatorische Faktoren für die LCAT betrachtet werden und in welchem Ausmaß sind sie Folge der Enzymaktivität an sich? Welche Bedeutung haben die "in vitro" Untersuchungen der LCAT-Enzym-Regulation für das Verständnis der Vorgänge "in vivo"? Welcher Art ist die Beziehung zwischen LCAT-Aktivität, Cholesterinumsatz und Atherogenität der Lipidstoffwechsellaage?

Eine Annäherung an diesen Problemkreis ist möglich durch die gezielte Beeinflussung und Analyse definierter Parameter des Lipidstoffwechsels. Beschritten wurde dieser Weg über die Untersuchung der LCAT-Aktivität im Verlauf diätetischer und medikamentöser Interventionen. "In vitro" wurde die Regulation der LCAT-Aktivität durch Apolipoprotein A-I unter besonderer Berücksichtigung des Apolipoprotein A-I Isoformenmusters untersucht. Der Zusammenhang der "in vivo" und der "in vitro" Studien ergibt sich aus der Tatsache, daß Apolipoprotein A-I Kofaktor des LCAT-Enzyms (7,8) ist, und daß sowohl Konzentration als auch Isoformenmuster dieses Apolipoproteins durch diätetische und medikamentöse Interventionen beeinflusst werden können.

Der methodische Ansatz der Diätstudien sowie der  $\beta$ -Sitosterin-Studie war in den entsprechenden von der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungsreihen gegeben. Für die Apolipoprotein A-I betreffenden Studien stand von der Arbeitsgruppe gereinigtes Apolipoprotein A-I zur Verfügung. Die primäre Problemstellung der Arbeit bestand daher zunächst in der Etablierung einer geeigneten Meßmethodik der LCAT-Aktivität.

Die LCAT-Aktivität wird ermittelt über die Verminderung des freien Cholesterins im Serum nach Inkubation bei 37°C. Der Bestimmung der Veresterungsrate liegt also die Messung des freien Cholesterins im Serum zugrunde. Aufgrund der niedrigen Veresterungsaktivität im Serum (40-200 nmol/mlxh) sind hohe Anforderungen an die Sensitivität der Cholesterin-Bestimmung gestellt. Im Vordergrund steht daher das Problem der Cholesterin-Meßmethodik. Generell können zwei Ansatzpunkte unterschieden werden:

1. Klinische Untersuchungen der LCAT-Aktivität bei großen Probandenzahlen fordern bei Einhaltung einer optimalen Sen-

sitivität eine möglichst gute Praktikabilität und Reproduzierbarkeit der Meßmethodik. Diesen Forderungen genügt der enzymatische Cholesterin-Nachweis eher als die zwar hochsensitiven aber mit erheblichem Zeitaufwand belasteten Radioisotopenmethoden. Zudem erlaubt die enzymatische Cholesterinbestimmung einen LCAT-Assay, der als Eigensubstrat-Assay gehandhabt werden kann (35,42,82,100).

2. Fragestellungen, die sich auf molekularere Ebene mit LCAT-Apolipoprotein -Interaktionen beschäftigen, können mit enzymatischen Cholesterin-Bestimmungsmethoden nicht bearbeitet werden. Zum einen ist eine höhere Sensitivität der Meßmethodik erforderlich, zum anderen wird die enzymatische Cholesterinbestimmung durch Antioxidantien inhibiert, die der Stabilisierung gereinigter LCAT-Fraktionen dienen. Große Bedeutung kommt weiterhin der Frage zu, welche physiologische Bedeutung die Feststellung der Veresterungsrate im Serum hat. Einerseits resultiert sie aus der Enzymkonzentration an sich, andererseits ist die Veresterungsaktivität entscheidend bedingt durch das Lipid-Lipoproteinemilieu, in dem die Reaktion abläuft. Aus dieser Gegebenheit resultieren zwei methodische Ebenen:

1. Die Messung der Veresterungs-Aktivität mit Hilfe des Eigensubstrat-Assays, der die Enzymaktivität im physiologischen Medium mißt. Dieser Assay läßt keinen direkten Rückschluß auf die LCAT-Enzymkonzentration zu. In Annäherung an die "in vivo" Situation spiegelt der Eigensubstrat-Assay die Summe der aktivierenden und inhibierenden Faktoren unter Mitteinbeziehung der Enzymkonzentration wider.

2. Die Messung der Veresterungs-Aktivität mit Hilfe des Fremdsubstrat-Assays erlaubt eine Aussage über die Enzymkonzentration insofern, als die Veresterungsaktivität in einem standardisierten Lipid- und Lipoproteinemilieu untersucht wird. Individuelle, nicht Enzym-bezogene Variablen treten damit in den Hintergrund.

Aus der Analyse der Meßmethodik wird deutlich, daß spezifische Fragestellungen bezüglich der LCAT mit einem differenzierten Assay-System angegangen werden können. Erst nach ausreichender Definition und Sicherung der problem-spezifischen Methodik der LCAT-Messung war es deshalb gerechtfertigt, auf Fragen zu Funktion und Regulation der LCAT im Lipidstoffwechsel einzugehen.

Bei der Analyse der Regulation der LCAT-Aktivität fällt auf, daß ungeachtet der Kofaktoreigenschaften von Apolipoprotein A-I (7,8) eine direkte Korrelation von LCAT-Aktivität und Apolipoprotein A-I Konzentration "in vivo" bisher nicht nachgewiesen wurde (142,156). Andererseits ist bekannt, daß die LCAT-Aktivität im Serum sowie Konzentration und Isoformenmuster von Apolipoprotein A-I entsprechend der Lipidbelastung des Stoffwechsels modifiziert werden. Es ist also möglich, daß dem Isoformenmuster oder den verschiedenen Isoformen an sich eine regulatorische Funktion bezüglich der

LCAT-Aktivität zukommt. Eine eindeutige Charakterisierung der Apolipoprotein A-I Isoformen ist bisher nicht geleistet worden. So führte die Definition der Isoformen über die isoelektrischen Punkte zu widersprüchlichen Resultaten (57,104,169). Es stellte sich also die Frage einer ausreichenden und u.U. neuen Definition der Apolipoprotein A-I Isoformen und in einem weiteren Schritt die Frage ihrer Funktion als Kofaktoren der LCAT-Aktivität.

Voraussetzung für eine adäquate Analyse der Kofaktoreigenschaften von Apolipoprotein A-I Isoformen ist, daß die LCAT-Enzympräparationen frei von endogenem Apolipoprotein A-I sein müssen. Aus diesem Grunde wurde eine partielle LCAT-Enzymreinigung durchgeführt.

Die Untersuchung der LCAT-Aktivität im Verlauf diätetischer und medikamentöser Interventionen stellt den pathophysiologischen Zusammenhang wieder her, in den sich auch die Analyse der Apolipoprotein-LCAT-Interaktionen einordnen lassen muß. Sowohl die  $\beta$ -Sitosterinstudie als auch die Diätstudien können als Modelle einer definierten Beeinflussung des Lipidmetabolismus betrachtet werden. Beide Studien sind geeignet, die Regulation der LCAT-Aktivität zuallererst aus dem Blickwinkel des Cholesterins zu betrachten. Den Untersuchungen zugrunde lag das Ziel einer Minderung des Atheroskleroserisikos durch eine Senkung insbesondere des LDL-Cholesterins, wobei das HDL-Cholesterin als antiatherogener Faktor möglichst nicht gesenkt werden sollte. Zwei Wege der Beeinflussung des Cholesterin-Stoffwechsels wurden beschritten: Zum einen über das Cholesterinanalogen  $\beta$ -Sitosterin, zum anderen über eine Diät, die sowohl cholesterinarm als auch polyensäurereich war. Bekannt ist der cholesterinsenkende Effekt sowohl von  $\beta$ -Sitosterin (21,23,86) als auch von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (95,118,125,131,152,157). Der exakte pathophysiologische Mechanismus der Cholesterinsenkung ist jedoch für beide Interventionsmöglichkeiten nicht eindeutig geklärt.

$\beta$ -Sitosterin ist ein reines Phytosterin, das vom Menschen nicht synthetisiert wird (124). Es unterscheidet sich vom strukturverwandten Cholesterin durch eine Äthylgruppe an C-24. Die enterale Resorptionsrate liegt bei 5% und ist damit etwa 10-fach niedriger als für Cholesterin (27,67,124).  $\beta$ -Sitosterin wird von der LCAT mit einer geringfügig niedrigeren Veresterungsrate im Serum verestert (81) und imponiert im Vergleich zu Cholesterin durch eine deutlich höhere Turnoverrate (124). Die  $\beta$ -Sitosterin-Therapie wurde bei Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie Typ IIa durchgeführt. Über die Wirkung von  $\beta$ -Sitosterin auf die LCAT-Aktivität liegen in der Literatur bisher keine Untersuchungen vor. Von besonderem Interesse ist zudem der kinetische Aspekt der  $\beta$ -Sitosterin-bedingten Lipidstoffwechsel-Veränderungen. In diesem Sinne wurde auch auf die Frage der Dauer einer sinnvollen  $\beta$ -Sitosterin-Therapie eingegangen.

Die Ernährungsstudien wurden nach dem Gesichtspunkt der Entwicklung einer langfristig praktikablen, therapeutischen Diät durchgeführt. Die Diät war definiert durch eine Beschränkung des Nahrungscholesterins auf 250-300 mg/Tag sowie eine Anhebung des Quotienten aus gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren ( $P/S=1.0$ ). Die Berichte über eine Beeinflussung der LCAT-Aktivität im Serum durch Diätmodifikationen sind vielfältig, jedoch keineswegs eindeutig (60,95,152, 159). Ein direkter Vergleich der Diätstudien ist aufgrund unterschiedlicher Diätkomposition und uneinheitlicher Probandenkollektive nur schwer möglich. Zudem wurde bisher die Bedeutung der vordiätetischen Ernährung der Probanden völlig unterschätzt. Die hier vorgestellte Ernährungsstudie wurde deshalb an gesunden Probanden unter Miteinbeziehung einer Kontrolldiät durchgeführt. Untersuchungen der LCAT-Aktivität bei Probanden, die nach einer definierten Kontrolldiät eine fettmodifizierte Diät erhielten, sind bisher nicht beschrieben worden. In dem neuen Zusammenhang einer optimierten Standardisierbarkeit der Studienbedingungen verspricht die Untersuchung der LCAT-Aktivität unter Berücksichtigung der Lipoprotein- und Lipidparameter neue Einblicke in die pathophysiologische Funktion der Cholesterin-Veresterung im Serum.

Zusammenfassend bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der kritischen Analyse einer problemspezifischen Meßmethodik der LCAT-Aktivität sowie der Anwendung dieser Methodik bei klinischen und molekular-biochemischen Fragestellungen zur Regulation der LCAT-Aktivität.

## 2. Methodik

=====

### 2.1. Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensubstrat-Methode

-----

Der enzymatische LCAT-Assay wurde in modifizierter Form nach Nagasaki und Akanuma (100) durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der enzymatischen Messung des unveresterten Cholesterins, dessen Konzentration im Rahmen des LCAT-bedingten Veresterungsschrittes abnimmt. Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen (Serva 57660) wurden in den Eigensubstrat-Assay eingeführt, um die Linearität der initialen LCAT-Reaktion zu verlängern und damit die Meßgenauigkeit der Methode zu erhöhen. Die Cholesterin-Bestimmung wurde routinemäßig mit Hilfe des Merkotest Kits (Merk 14106) nach der Methode von Richmond et al. (121) durchgeführt. Für vergleichende Untersuchungen bezüglich der Sensitivität des Cholesterin-Bestimmungsverfahrens wurde das Testsystem der Fa. Boehringer (124087) nach Röschlau et al. (122) sowie der von Akanuma et al. vorgeschlagene (100) Assay analysiert.

#### 2.1.1. Darstellung des Assays

-----

150  $\mu$ l Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen (25mg/10ml Tris/HCl pH 7,4) und 300  $\mu$ l Serumprobe wurden in ein Eppendorf-Cup (A) eimpipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden 200  $\mu$ l aus der Ansatzlösung in ein 2. Eppendorf-Cup (B) gegeben und bei 4°C aufbewahrt. Die im Cup (A) verbleibenden 250  $\mu$ l wurden über 60 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die LCAT-Reaktion wurde beendet durch Überführung der Proben in ein Eiswasserbad. Unmittelbar anschließend erfolgte die Cholesterinbestimmung sowohl der bei 4°C (B) als auch der bei 37°C (A) inkubierten Probe. Dazu wurden 50  $\mu$ l der Proben mit einem automatischen Probe/Reagenz-Dosiergerät (Eppendorf 5231) zu 1000  $\mu$ l der Farbreagenzlösung hinzugegeben. Der Cholesterinfarbensatz, der eine Farbreagenzlösung (Merk 14106) sowie eine Cholesterin-Oxidase (Merk 14108) enthält, wurde nach kurzem Mischen über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion beider Proben A (E1) und B (E2) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 366nm ermittelt. Die Extinktion E1 der Probe A fällt aufgrund der Cholesterinveresterung durch die LCAT niedriger aus, da im Assay nur das freie Cholesterin bestimmt wird. Über eine parallel mitlaufende Standardlösung wurde aus  $\Delta E = E1 - E2$  die in 60 Minuten veresterte Cholesterinmenge ermittelt. Die LCAT-Aktivität wurde in den Einheiten nmol/mlxh als molare LCAT-Aktivität (MER) und in %/h als fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) angegeben. Alle LCAT-Aktivitätsbestimmungen wurden routinemäßig als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zur Herstellung des Cholesterin-Standards wurde 3,87mg unverestertes Cholesterin (Serva 17090) zu 2ml Aqua dest. gegeben und mittels Ultraschall dispergiert. Das Volumen dieser Lösung wurde nach Zugabe von 200mg Triton X-100 mit Aqua dest. auf 10ml gebracht. Die so gewonnene Standardlösung war nach 1-stündiger Inkubation bei 50°C unter steter Durchmischung gebrauchsfertig. Alternativ kam ein Cholesterin-Standard der Fa. Boehringer (Preciset) zur Anwendung.

Die Berechnung der LCAT-Aktivität erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{MER} = \frac{\Delta E \text{ probe} \times C \text{ standard}}{E \text{ standard}} \times 1,5 \text{ [ nmol/mlxh ]}$$

$$\text{FER} = \frac{\Delta E \text{ probe}}{E2} \times 100 \text{ [ \% /h ]}$$

#### 2.1.2. Herstellung der Dipalmitoyl-Lecihin-Liposomen

Die Liposomen wurden mittels Ultraschall-Dispersion des Dipalmitoyl-Lecithins (Serva 57660) in wässriger Lösung (20mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, 1mM EDTA) unter Verwendung des Branson-Sonifiers (B-15) hergestellt. Die Lipid-Dispersion (25mg Lecithin/10ml Tris/HCl) wurde in Glasgefäßen (Höhe 50mm, Öffnungsdurchmesser 15mm) durchgeführt. Die Beschallung erfolgte bei einem Output-Level Stufe 5 dreimal jeweils drei Minuten lang. Um eine Überhitzung der Probe über 70°C zu vermeiden, wurden jeweils zwei Minuten lange Beschallungspausen im Eiswasserbad eingeführt. Die vollständige Emulsion des Dipalmitoyl-Lecithins wurde makroskopisch durch die Klärung der vormals milchig trüben Lösung objektivierbar.

#### 2.2. Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsupstrat-Methode

Der Fremd-Substrat-Assay nach Bartholome et al. (18) mißt die LCAT-Aktivität im Fällungsüberstand nach vollständiger Lipoproteinpräzipitation mit Natriumphosphorwolframat (Merk 583) und Magnesiumchlorid (Merk 5833). Als standardisiertes Substrat dienen in diesem Assay Liposomen aus Dilinoyl-Lecithin und unverestertem Cholesterin. Die LCAT-Aktivität im lipoproteinfreien Überstand wurde enzymatisch unter Verwen-

dung des Merkotest Cholesterin-Bestimmungs-Kits gemessen.

### 2.2.1. Darstellung des Assays

---

200µl Fällungsüberstand und 200µl Lecithin/Cholesterin-Liposomen wurden vereinigt, gründlich durchmischt und auf zwei Eppendorf-Cups verteilt. Cup B wurde als Vergleichsprobe bei 4°C inkubiert, Cup A wurde 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. 50µl der jeweiligen Proben wurden zu jeweils 1000µl Farbreagenz gegeben. Die Extinktion wurde nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C abgelesen.

### 2.2.2. Delipoproteinisierung der Serumprobe

---

#### 2.2.2.1. Lipoproteinpräzipitation

---

Die Delipoproteinisierung der Serumprobe wurde entsprechend den Angaben von Burstein et al. (30,31) durchgeführt. Dazu wurden 50µl NaPW 40%, 50µl MgCl<sub>2</sub> 4M und 1ml Serum in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur 10 Minuten lang bei 6000g und 4°C in einem 40.3 Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Fällungsüberstand, der LCAT-Enzym und ausreichende Konzentrationen an Apolipoprotein A-I enthielt, wurde isoliert. Zur Komplexierung überschüssiger Magnesiumchlorid-Ionen wurde dem Überstand in äquimolarer Konzentration (0.182 M) Natriumcitrat zugesetzt, um eine Präzipitation der im folgenden zugegebenen Liposomen zu verhindern.

#### 2.2.2.2. Delipoproteinisierung mittels präparativer Ultrazentrifugation.

---

Alternativ zu dem Verfahren der Lipoproteinpräzipitation wurde das Verfahren der präparativen Ultrazentrifugation nach Havel et al. (72) unter Verwendung der Schneidetechnik durchgeführt.

Zur Gewinnung der d>1,210 g/ml-Fraktion wurde die Dichte der Serumprobe mit Kaliumbromid auf 1,210g/ml eingestellt. Dazu wurden 978mg Kaliumbromidsalz in Polyallomereröhrchen (13x64 mm), Beckmann 326820) eingewogen. Nach Zugabe von 3ml der Serumprobe wurden die Zentrifugenröhrchen mit einer KBr-Lösung (16.8g KBr/50ml) auf ein Volumen von 6ml aufgefüllt. Mittels eines Schraubverschlusses wurden die Röhrchen fest verschlossen und konnten dann nach vollständiger Lösung des KBr-Salzes in den 40.3 Rotor eingebracht werden. Die Ultrazentrifugation wurde bei 4°C über 24 Stunden mit einer Drehzahl von 50000 Upm in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (L5-75) durchgeführt. Nach Beendigung der Ultrazentrifugation wurden

die Polyallomerröhrchen dergestalt geschnitten, daß 1,5ml Unterstand entsprechend einer Dichte größer als 1.210g/ml von 4,5ml Überstand ( $d < 1.210\text{g/ml}$ ) getrennt wurde. Zur Entsalzung wurde die  $d > 1.210\text{g/ml}$ -Fraktion gegen 50mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 1mM EDTA über 15 Stunden bei 4°C dialysiert.

### 2.2.3. Herstellung der Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-

#### Liposomen

Die als standardisiertes Substrat dem Fällungsüberstand zugegeben Liposomen wurden aus Dilineoyl-Lecithin (Merk 5331), unverestertem Cholesterin (Serva 17090) und Dicetylphosphat (Serva 19301) mittels Ultraschallbehandlung hergestellt.

Phosphatidylcholin 31,9mg, Cholesterin 4,4mg und Dicetylphosphat 3,1mg wurden im molaren Verhältnis von 7,6:2:1 in einem 50ml-Mittelhals-Glasspitzkolben eingewogen und mittels 5ml Chloroform in Lösung gebracht. Die Evaporation des Chloroforms erfolgte in einem Rotationsverdampfer, wobei durch die Rotation des Spitzkolbens dessen Innenwand gleichmäßig mit einer Lipidschicht bedeckt wurde. Nach vollständiger Entfernung des Chloroforms wurden 3ml 0.01 M Phosphatpuffer pH 7,4 sowie fünf entfettete Glasperlen (Durchmesser 3mm) in den Spitzkolben gegeben. Der Spitzkolben wurde daraufhin auf einem Whirl-mix Schüttelgerät über 15 Minuten heftig geschüttelt. Im Rahmen des Schüttelvorganges entstand eine milchig trübe Lipidemulsion, die umgehend einer Ultraschallbehandlung zugeführt wurde. Die Ultraschallbehandlung wurde entsprechend den Angaben für die Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen-Herstellung bis zur vollständigen Klärung der Liposomenlösung durchgeführt. Die so erhaltenen Liposomen waren über mindestens 14 Tage stabil.

Um eine optimale Standardisierung des Fremdsubstrates zu erreichen, wurde eine säulenchromatographische Reinigung der Liposomen über Sepharose 6-B durchgeführt. Dazu wurde eine 250mm hohe Glassäule mit Sinterfritte und einem Innendurchmesser von 15mm verwendet. 3ml der Liposomenlösung wurden auf die Sepharose 6-B Säule aufgetragen. Die Liposomen wurden mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4 bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 120 ml/Stunde und einem Fraktionsvolumen von 1,5ml im Leervolumen eluiert. Die gereinigten Liposomen wurden erkennbar an der Trübung des Reagenzglasinhaltes in den Fraktionen 10-12 wiedergefunden und vereinigt.

Die Phospholipid-Konzentration der gereinigten Liposomen wurde nach der Methode von Takayama et al. (145) mittels der gebrauchsfertigen Kombination der Fa. Boehringer (691844) gemessen. Die Konzentration des unveresterten Cholesterins wurde mittels des Merk-Kits ermittelt. Die Cholesterin-Konzentration wurde so eingestellt, daß sich im Ansatz eine Cholesterin-Konzentration von etwa 1,29mM ergab.

## 2.3. Die LCAT-Aktivitätsmessung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays

---

Die Messung der LCAT-Aktivität mit Hilfe des Radioisotopen-Assays erfolgte über die Bestimmung des Umsatzes von unverestertem zu verestertem Tritium-markierten Cholesterin. Die Radioaktivität in den Fraktionen des veresterten bzw. des unveresterten Cholesterins wurde vor und nach der LCAT-Reaktion bestimmt. Der Radioisotopen-Assay kann in vier Abschnitte eingeteilt werden: 1. LCAT-Reaktion mit [3H]-Cholesterin; 2. Lipidextraktion; 3. Dünnschichtchromatographie; 4. Radioaktivitätsmessung.

### 2.3.1. Darstellung des Radioisotopen-Assays

---

Die Ansatzmischung setzte sich zusammen aus 100µl bovinem Serumalbumin 2,5% (Serva 11924), 100µl Liposomen, 40µl 2-Mercaptoaethanol 60mM (Serva 26625), 50µg Apo-HDL oder 10-20µg Apolipoprotein A-I sowie 5-10µl der LCAT-Enzym-Präparation. Das Reaktionsvolumen bestand aus 250-300µl. Als Pufferlösung wurde ein 50mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 1mM EDTA verwandt.

Die in dem Radioisotopen-Assay eingesetzten Liposomen wurden aus Phosphatidylcholin und unverestertem Cholesterin im molaren Verhältnis von 4:1 hergestellt. Dazu wurden 100nmol Phosphatidylcholin und 25nmol Cholesterin auf 100µl Liposomen-Lösung verwandt.

Als radioaktives Markermolekül diente [1,2-3H]-Cholesterin 0.2µCi/100µl Liposomen (NEN, NET 139, spez. Akt. 54,8 µCi/nmol). Die Liposomen wurden mittels Ultraschallbehandlung hergestellt und über Sepharose 6-B gereinigt. Cholesterin- und Phosphatidylcholin-Konzentrationen wurden enzymatisch bestimmt (siehe oben).

Der Ansatz bestehend aus bov. Serumalbumin, 2-Mercaptoaethanol, Apo-HDL bzw. Apolipoprotein A-I und Liposomen wurde 12 Stunden lang bei 4°C vorinkubiert. Zu Beginn der Vorinkubation erfolgte eine niedrig-energetische Ultraschallbehandlung. Ziel der Vorinkubation war die Optimierung der Interaktion von Apolipoprotein und Liposomen. Nach Beendigung der Vorinkubation wurde die LCAT-Reaktion durch Hinzugabe der LCAT-Enzympräparation gestartet. Die Ansatzmischung wurde bei 37°C über 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch die Lipidextraktion.

Die LCAT-Aktivität wurde folgendermaßen berechnet: Setzt man die Radioaktivität über der Cholesterinester-Fraktion vor der LCAT-Reaktion gleich Null, so kann die fraktionale LCAT-Rate folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{FER} = \frac{100 \times \text{CE}}{\text{UC} + \text{CE}} \times \frac{1}{t} \quad [\% / \text{h}]$$

Die Messung eines CE-Leerwertes vor der LCAT-Reaktion dient dann nur zur Ermittlung der Rausch-Zählrate. Die molare LCAT-Aktivität errechnet sich aus der FER.  $\text{MER} = \text{FER} \times \text{UCI} [\text{nmol/ml} \times \text{h}]$ . UCI ist dabei die enzymatisch bestimmte Konzentration des unveresterten Cholesterins vor der LCAT-Reaktion.

### 2.3.2. Lipidextraktionsverfahren

Das Lipid-Extraktionsverfahren mit Äthanol/n-Hexan wurde nach den Angaben von Papsani et al. (112) durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des LCAT-Assay-Mediums (200-300 µl) in ein mit Glasstopf verschließbares 10-ml Reagenzglas einpipettiert. Durch Zugabe von 2ml Äthanol (Merk 972) und 3ml n-Hexan (Merk 4367) wurde mit der Proteinpräzipitation der LCAT-Reaktionsstop erreicht.

Die Lipid-Extraktion erfolgte durch 30 Minuten lange Schüttelinkubation. Die n-Hexan-Oberphase wurde durch Zentrifugation bei 5000 Upm über 15 Minuten abgetrennt und in ein separates Reagenzspitzglas gegeben. Dieser Extraktionsvorgang wurde 2 mal wiederholt und die vereinigten, das Lipidextrakt enthaltenden, n-Hexan Oberphasen wurden unter Stickstoffeinblasung bei 37°C evaporiert.

Bei den sehr niedrigen Cholesterin-Konzentrationen im LCAT-Assay wurden als Marker für die DC jeweils 50 µg Cholesterin-ester und unverestertes Cholesterin (gelöst in 500 µl Chloroform) zu dem Lipidextrakt hinzugegeben. Das Reagenzglas wurde zweimal mit jeweils 1ml Chloroform gewaschen, das ebenfalls evaporiert wurde. Vor dem Auftragen auf die DC-Folie wurde das Lipidextrakt in 75-100 µl Chloroform gelöst.

### 2.3.3. Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie wurde als Laufmittel Petroläther (Merk 1769), Diäthyläther (Merk 921) und Eisessig (Merk 62E) im Verhältnis 85:15:1 v/v/v verwandt. Das Laufmittel wurde täglich neu hergestellt und in die mit Filterpapier ausgekleidete Chromatographiekammer bis zu einer Höhe von 10mm eingefüllt.

Als Standardlösungen zur Identifikation der Lipidbanden wurden folgende Reagenzien verwendet: Palmitinsäure (Serva 31389), unverestertes Cholesterin (Serva 17090), Cholesterinmyristat (Serva 17114), Tristearin (Serva 37209), Dipalmitoyl-Lecithin (Serva 57660). Sämtliche Reagenzien wurden in einer Konzentration von 25mg/2ml Chloroform aufbewahrt.

Die zu untersuchenden Lipidextrakte wurden auf die Silika-Gel-Aluminiumfolie (Merk 5553) mittels einer 25- $\mu$ l Eppendorfpipette in einer Bandbreite von 15mm und einem jeweiligen seitlichen Abstand von ebenfalls 15mm horizontal aufgetragen, wobei ein Abstand von 20mm zum Unterrand der Folie eingehalten wurde. Die optimale Trennung von Cholesterinester und unverestertem Cholesterin wurde bei einer Höhe der Laufmittelfront von 170mm erreicht. Nach Beendigung der Chromatographie und Trocknung der DC-Folie (10 Minuten bei Zimmertemperatur) wurden die Lipidbanden durch 2 Minuten lange Jod-Dampf-Exposition braun angefärbt. Die Identifikation der Banden erfolgte über den Vergleich mit den Standardbanden. Die Cholesterin-Fractionen wurden markiert, nach Sublimation der Jodfärbung geschnitten und in ein Szintillationsgefäß eingebracht. Als Szintillationsmittel diente Rotiszint 11 (Fa.Roth). Die Radioaktivitätsmessung erfolgte in einem  $\beta$ -Counter (BF Beta-szint 5000/300).

#### 2.3.4. Digitonin-Fällung

---

Die Methode der Digitonin-Präzipitation nach Piran et al. (97,116,117) beruht auf der isolierten Ausfällung von Proteinen und unverestertem Cholesterin, wobei die Cholesterinester in Lösung bleiben. Diese Methode umgeht also die zeitaufwendige chromatographische Trennung der Lipide und macht gleichzeitig den Lipidextraktionsprozess überflüssig.

Zu 250-300 $\mu$ l des LCAT-Reaktionsvolumens wurden 2ml 1% Digitonin (Sigma 5628), gelöst in 98% Äthanol (Merk 972) gegeben. Nach 15 Sekunden langem gründlichen Durchmischen wurde die Präzipitationsreaktion durch Zugabe von 0.5mg unverestertem Cholesterin (gelöst in 100 $\mu$ l 98% Äthanol) vervollständigt. Das Präzipitat wurde bei 5000 U<sub>pm</sub> über 10 Minuten abzentrifugiert. Ein 500 $\mu$ l Aliquot wurde daraufhin zur Radioaktivitätsbestimmung in ein Szintillationsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 10ml Rotiszint 22 (Fa.Roth) erfolgte die Radioaktivitätsmessung der Cholesterinester-Fraktion in einem  $\beta$ -Counter.

#### 2.3.5. Reinigung des [3H]-Cholesterins

---

Um die insbesondere im Cholesterinester-Bereich mitlaufenden, bei der Dünnschichtchromatographie störenden, radioaktiven Verunreinigungen auszuschalten, war eine Reinigung des [3H]-Cholesterins unumgänglich. Die Reinigung des [3H]-Cholesterins erfolgte über eine dreimalige Dünnschichtchromatographie. Die Fraktion des unver-

esterten Cholesterins wurde durch Abkratzen des Kieselgurs aus dem Bandenbereich isoliert. Die Elution des [3H]-Cholesterins aus dem Kieselgur wurde durch 15 Minuten lange Schüttelinkubation mit 10ml n-Hexan und anschließendes Abzentrifugieren des Kieselgur-Rückstandes erreicht. Das Elutionsverfahren wurde drei mal durchgeführt. Der Erfolg der Reinigung wurde chromatographisch verifiziert.

#### 2.4. LCAT-Enzymreinigung

---

Die Reinigung des LCAT-Enzyms erfolgte in Anlehnung an die von Kitahatake et al.(81) beschriebene Methode. Die Reinigung erfolgte in fünf großen Abschnitten:

1. Chromatographie über DEAE Sephadex A-50; 2. Präzipitation mit Ammoniumsulfat und Butanol; 3. Chromatographie über DEAE-Sephadex A-50; 4. Präzipitation mit Dextransulfat /  $\text{CaCl}_2$ ; 5. Hydroxylapatit-Chromatographie.

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C in einer Kühlkammer oder im Eiswasserbad durchgeführt. Als Pufferlösung diente ein  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - Puffer, pH 7,4, Ionenstärke 0,1, 0,025 % EDTA. Die Säulenchromatographie wurde durchgeführt mit Hilfe einer LKB-Detektor-Kontrolleinheit (Uvicord III, 2089), die mit einer Pumpeinheit (LKB Perplex, 10200) und einem Fraktionssammler (LKB Ultrarac 7000) verbunden war. Die Chromatographie erfolgte bei einer Detektorwellenlänge von 254nm. Die Proteinkonzentrationen während der Enzym-Reinigung wurden mit Hilfe der Lowry-Technik bestimmt, die Enzymaktivität wurde mittels des Radioisotopen-Assays verfolgt.

##### 1. Chromatographie über DEAE-Sephadex A-50

1,5l gepooltes Serum wurde mit 1l Aqua bidest auf ein Volumen von 2,5l verdünnt (Serum/H<sub>2</sub>O=3:2 v/v). Zu dem verdünnten Serum wurden 25g DEAE Sephadex A-50 Granulat (Pharmacia 17-0180-0) hinzugegeben (1g/100ml). Diese Aufschwemmung wurde bei 4°C über 16 Stunden unter stetiger Durchmischung inkubiert. Daraufhin wurde das DEAE-Sephadex Gel über einen Papierfilter von der flüssigen Phase abgetrennt und nach Waschen mit 1l Phosphatpuffer in eine Chromatographie-Glassäule (Innendurchmesser 50mm, Höhe 500mm) eingefüllt. Die Säule wurde nach Waschung mit 2l Phosphatpuffer, 20mM NaCl eluiert mit einem 0.14M NaCl enthaltenden Phosphatpuffer. Bei einem Flow von 3ml/Minute und einem Fraktionsvolumen von 9,8ml wurde der Hauptprotein-Peak in den Fraktionen 56-96 gefunden.

## II. Behandlung mit Ammoniumsulfat/Butanol

Zu 400ml der gepoolten Proteinfraktion wurde unter stetigem Rühren kalte, gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung (Merk 1217) bis zu einem Sättigungsgrad von 40% gegeben. Die Lösung wurde mit vorgekühltem Butanol (Merk 1990) im Verhältnis 1/2 (v/v) versetzt und nach kräftiger Durchmischung über 30 Minuten bei 4°C und 13200g zentrifugiert. Das in der Interphase präzipitierte Protein wurde gepoolt und in 200ml Phosphatpuffer gelöst. Die Proteinpräzipitation wurde wiederholt woraufhin die Proteinfraktion in 160ml Phosphatpuffer gelöst und 24 Stunden lang gegen einen Phosphatpuffer dialysiert wurde. Der während der Dialyse entstandene Niederschlag wurde 30 Minuten lang bei 4°C und 13200g abzentrifugiert und verworfen.

## III. Chromatographie über DEAE Sephadex A-50

Die Proteinfraktion wurde nach der Dialyse auf eine mit DEAE Sephadex A-50 gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen (Innendurchmesser 30mm, Höhe 400mm), die zuvor mit Phosphatpuffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde nach Waschung mit 400ml Phosphatpuffer 0,14M NaCl mit einem 0,24M NaCl Phosphatpuffer eluiert. Bei einem Flow von 0,5ml/Minute und einem Fraktionsvolumen von 6ml wurde der Hauptprotein-Peak in den Fraktionen 30-52 gefunden. Diese Fraktionen wurden gepoolt und dialysiert. Die Proteinkonzentration lag bei 1,85 mg Protein/ml.

## IV. Präzipitation mit Dextransulfat/Calciumchlorid

Zu der dialysierten Enzymfraktion wurde 2M CaCl<sub>2</sub> gegeben, bis eine Konzentration von 30mM erreicht war. Der pH wurde mit 0,1M HCl auf 5,3 eingestellt. Die Präzipitationsreaktion wurde daraufhin mit 1,2mg Dextransulfat (3%, pH 5,3) pro 1,0mg Protein eingeleitet. Nach 30 Minuten langer Inkubation bei 4°C und gelegentlichem Mischen wurde der Überstand abzentrifugiert (20 Minuten bei 10000g). Der pH des Überstandes wurde mit 0,1M NaOH auf 7,4 eingestellt. 3M KCl wurde bis zu einer Konzentration von 0,5M hinzugegeben. Nach erneutem Abzentrifugieren der Dextransulfat-Aggregate wurde der Überstand gegen Phosphatpuffer pH 6,8, 4mM Mercaptoäthanol dialysiert. Bei einem Gesamtvolumen von 105ml lag die Proteinkonzentration nach der Dialyse bei 0,403mg/ml.

## V. Chromatographie über Hydroxylapatit

Die dialysierte Proteinfraktion wurde auf eine mit Hydroxylapatit (Serva 25514) gefüllte Säule (Höhe 100mm, Innendurchmesser 10mm) aufgetragen, die zuvor mit 1mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,8 äquilibriert worden war. Dabei wurden 3mg Protein auf 3ml Packungsvolumen gegeben. Die Säule wurde mit 30ml 1mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 gewaschen und mit 4mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,8 eluiert. Bei einem Flow von 0,4ml/Minute und einem Fraktionsvolumen von 1,5ml wurde die Enzymaktivität in den Fraktionen 32-35 wiedergefunden.

Die so gereinigte Enzymfraktion wurde bei 4°C unter Stickstoff in 0,4mM Phosphatpuffer, 4mM 2-Mercaptoäthanol aufbewahrt. Die Proteinkonzentration nach der Hydroxylapatit-Chromatographie lag bei 4µg/ml.

## 2.5. Isolierung von Apolipoprotein A-I

-----

Serumproben freiwilliger normolipidämischer Spender wurden nach 12-16 stündigem Fasten entnommen und gepoolt. Die HDL-Fraktion wurde nach Präzipitation der übrigen Serumlipoproteine mit Phosphorwolframsäure (Lopes Virella 88) und darauf folgender Ultrazentrifugation bei einer Dichte von 1,210g/ml und einer Temperatur von 4°C in einem 50-Ti-Beckmann-Rotor nach dem Verfahren von Havel et al. (72) isoliert. Nach einem Dialyseschritt wurden die HDL lyophilisiert und anschließend mit Äthanol/Diäthyläther (3:1 v/v) in 20-fachem Überschuß delipidiert (29). Die konzentrierten delipidierten HDL wurden unter Stickstoff getrocknet. Die Trennung des Apolipoprotein A-I von den übrigen HDL-Apolipoproteinen erfolgte durch Gel-Permeationschromatographie nach der Methode von Kane et al. (78). Die Reinheit der isolierten Apolipoproteine wurde mittels Polyacrylamidelektrophorese in 8M Harnstoff bzw. mittels der SDS PAGE-Technik überprüft (160,161).

## 2.6. Fraktionierung von Apolipoprotein A-I mittels Umkehrphasen-HPLC

-----

Die Fraktionierung des Apolipoprotein A-I wurde von Herrn Dr. W.O.Richter durchgeführt.

Zur Trennung der Apolipoprotein A-I Isoformen wurde die Umkehrphasen-HPLC verwendet. Zur Anwendung kamen zwei Altex-Systeme (110 A), die durch einen Altex-Programmierer (420) kontrolliert wurden und mit einem variablen Wellenlängendetektor (Uvicon LC-725) ausgestattet waren. Die Säulen enthielten entweder ein PNP-I d.h. Polyacrylamid-Gel (Fa. Hamilton) bei einer Säulenabmessung von 150x4mm oder ein Aquapore RP-300-Gel d.h. ein Silica-Gel der Firma Kontron (Säulenabmessung 250x4,2mm). Bei einer Flowrate von 1ml/Minute, 21°C und einem Injektionsvolumen von 100µl kamen ein Puffer A (0,1M Natriumphosphat-Puffer, pH 2,1) sowie ein Puffer B (Acetonitril) als Eluens zur Anwendung. Die Trennung der eingesetzten Proteine erfolgte mit einem Linearen Gradienten des Puffers B von 30% auf 40%. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde bei 225nm gemessen. Apolipoprotein A-I wurde entweder in 100µl 0,1M Natriumphosphat-Puffer, pH 2,0, einem 0,01M Ammoniumbicarbonat-Puffer, pH 8,6 oder bei neutralem pH in 6M Harnstoff gelöst.

## 2.7. Probanden und Aufbau der Ernährungs -und Medika- menten-Studien

### 2.7.1.1. Probanden und Aufbau der Ernährungsstudie

Die Ernährungsstudie I (128,163) wurde in einer Haftanstalt durchgeführt und dauerte sechs Monate. Dreißig Männer (Altersbereich 22 bis 54 Jahre, im Mittel 34 Jahre) gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Auf Grund von Anamnese, klinischen -und Routinelaboruntersuchungen wurden internistische Erkrankungen, insbesondere Stoffwechselerkrankungen ausgeschlossen. Alle Probanden waren nach dem Broca-Index normalgewichtig. Alkohol-, Rauch -und Sportgewohnheiten blieben während des Beobachtungszeitraumes unverändert. Die Basiswerte für Körpergewicht ( $\pm 1,0$ kg) und Serumlipide ( $\pm 10\%$ ) blieben konstant in der Vorbeobachtungsphase von einem Monat (2 Messungen). Zwei Gruppen von jeweils 10 Probanden wurden dann nach einem Randomisierungsschema gebildet, das Alter, Körpergewicht -und Größe, Alkohol-, Rauch -und Sportgewohnheiten sowie Serumlipidkonzentrationen berücksichtigte.

Die Gruppe IKF (Kontrolldiät / fettmodifizierte Diät) erhielt drei Monate lang eine Kontrolldiät, die Gruppe IFK (fettmodifizierte Diät/Kontrolldiät) während des gleichen Zeitraumes eine fettmodifizierte Diät. Nach drei Monaten wurde gewechselt. Die eine Gruppe (IKF) erhielt jetzt für weitere drei Monate eine fettmodifizierte Diät, während die andere Gruppe (IFK) für drei Monate eine Kontrolldiät erhielt. Blutproben für Serumlipoproteinanalysen wurden zu Beginn der Studie und dann monatlich entnommen.

Die Ernährungsstudie II (77,165) wurde in einem Kloster durchgeführt und dauerte ebenfalls sechs Monate. Zehn Nonnen (Altersbereich 34 bis 58 Jahre, im Mittel 42 Jahre) gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Alle Probandinnen waren normalgewichtig. Die Basiswerte für Körpergewicht und Serumlipide blieben in der Vorbeobachtungsphase von einem Monat (zwei Messungen) konstant. Die Nonnen erhielten dann drei Monate lang eine fettmodifizierte Diät, anschließend weitere drei Monate eine Kontrolldiät. Blutproben für Serumlipid -und Serumlipoproteinanalysen sowie für die LCAT-Aktivität im Serum wurden nach drei und sechs Monaten entnommen.

Jahreszeitlich bedingte Veränderungen der Apolipoprotein-Konzentrationen wurden in der Ernährungsstudie I durch die "cross over" Messung weitgehend ausgeschlossen (Abbildung 2). Außerdem waren die Diätperioden mit jeweils drei Monaten Dauer hinreichend lang. Die zur Einhaltung der Diät getroffenen Maßnahmen waren dergestalt, daß diese Studie nahezu unter den Bedingungen einer stationären Überwachung der Probanden durchgeführt werden konnte.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden-Kollektive sind kleiner als in der Originalliteratur angegeben. Die Ursache dafür liegt in dem für die enzymatische LCAT-Aktivitätsmessung nur beschränkt zur Verfügung stehenden Probenmaterial.

#### 2.7.1.2. Diätzusammensetzung

---

Tabelle: 13

Beide Diäten bestanden aus gemischten Nahrungsmitteln mit 45% (der kalorischen Energie) Kohlenhydratanteil (16% einfache Zucker), 40% Fettanteil und 15% Proteinanteil (6% pflanzliches Protein). Beide Diäten enthielten 11,6g Faserstoffe pro Tag. Sie unterschieden sich im Cholesterinanteil (370mg/Tag in der Kontrolldiät, 250mg/Tag in der fettmodifizierten Diät), sowie im Gehalt von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ( $P/S = 0,3$  in der Kontrolldiät,  $P/S = 1,0$  in der fettmodifizierten Diät). Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren stammten von Sonnenblumenöl -und Margarine. Gesättigte Fettsäuren und Cholesterin kamen von magerem Fleisch, Wurst, Geflügel, Fisch, Milch und magerem Käse. Die Kalorienzufuhr war individuell, so daß das Körpergewicht im Untersuchungszeitraum konstant blieb.

Zwei Diätassistentinnen bereiteten die Mahlzeiten vor und verteilten sie. Es wurde gemeinsam unter Aufsicht gegessen. Die Diätadhärenz wurde durch Tagesprotokolle über sieben Tage jeden Monat und durch die Analyse der Serumcholesterin-ester-Fettsäuren überprüft.

#### 2.7.2. Patienten und Aufbau der Sitosterin-Studie

---

Die Patienten dieser Studie (162,164) befanden sich seit mindestens einem Jahr in der ambulanten Betreuung der Fettstoffwechselambulanz. Zur Untersuchung kamen 10 Patienten (6 Männer und 4 Frauen) im Alter zwischen 29 und 67 Jahren, die alle an einer primären Hypercholesterinämie Typ II a

litten. Fünf der untersuchten Patienten hatten klinische Zeichen einer koronaren Herzerkrankung. Frauen in gebärfähigem Alter wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle Patienten wurden ausführlich über die Studienbedingungen aufgeklärt und gaben daraufhin ihr schriftliches Einverständnis.

Aufgrund von Anamnese, klinischen - und Laboruntersuchungen wurden andere internistische Erkrankungen ausgeschlossen. Als Kriterium für das Vorliegen einer familiären Belastung wurde sichergestellt, daß mindestens ein Blutsverwandter mit gleichem Phänotyp der Hyperlipoproteinämie nachweisbar war. Alle Patienten waren mindestens sechs Monate vor Beginn der medikamentösen Therapie durch eine Diätassistentin auf eine typengerechte Diät eingestellt worden.

Diese Diät bestand aus einer isokalorischen, fettmodifizierten Kost mit einem Cholesterin-Gehalt von 250mg/Tag und einem P/S-Quotienten von 1,0. Die Diätadhärenz wurde durch monatliche Ernährungsprotokolle (über 24 Stunden) überprüft. Im Rahmen der Sitosterin-Studie wurde den Patienten 6g Sitosterin pro Tag oral verabreicht.

#### 2.7.3. Probanden zur Erhebung von Kontrollwerten

---

Für methodische Untersuchungen wurden Serumproben von gesunden Freiwilligen und Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie (Altersbereich 23 bis 67 Jahre im Mittel 39 Jahre) gewonnen. Alle Patienten wurden einer gründlichen ärztlichen Untersuchung unterzogen. Endokrinologische Erkrankungen sowie Leber- oder Nierenerkrankungen wurden mittels der üblichen Routinelaboruntersuchungen ausgeschlossen. Alle Probanden und Patienten für diese Untersuchungen waren nach dem Broca-Index normalgewichtig, hielten ihre körperliche Aktivität konstant, tranken kaum Alkohol (weniger als 1/2 l Bier oder ein Schoppen Wein pro Tag) und nahmen keine stoffwechselbeeinflussenden Medikamente ein.

Als Kontrollgruppe im Vergleich zu der Gruppe der hyperlipoproteinämie Typ IIa wurde ein Kollektiv aus 29 normolipidämischen Probanden (9 Frauen, 20 Männer im Alter von 22-54 Jahren) herangezogen.

#### 2.7.4. Serumgewinnung

---

Blutproben wurden nach 12-16 Stunden Fasten über Nacht aus der Kubitalvene des Armes am liegenden Patienten entnommen. Die Seren (ohne Zusatz) wurden vom Blutkuchen durch zweimaliges Zentrifugieren in einer niedrigtourigen Zentrifuge getrennt und auf 4°C gekühlt.

Die Isolierung der Serumlipoproteine und die Lipidbestimmung erfolgten unmittelbar danach. Proben zur Bestimmung von Apolipoproteinen und der LCAT-Aktivität wurden bei -25°C einge-

froren. Die durchschnittliche Verweildauer dieser Proben bis zur Analyse betrug 2 Monate.

#### 2.7.5. Analytische Methoden

-----

Gesamtcholesterin und Triglyzeride wurden enzymatisch mit gebrauchsfertigen Kits (Boehringer Mannheim) gemessen. Unverestertes Cholesterin wurde mittels des Cholesterin-Testansatzes der Firma Merck bestimmt. Die Konzentration des veresterten Cholesterins wurde aus der Differenz von Gesamtcholesterin und unverestertem Cholesterin berechnet. Die LCAT-Aktivität wurde in modifizierter Form nach Akanuma gemessen.

Der Cholesteringehalt wurde im Serum in den VLDL ( $d < 1,006$  g/ml), in der  $d > 1,006$  g/ml-Fraktion (LDL und HDL), in den HDL (Überstand nach Präzipitation mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid in der  $d > 1,006$  g/ml-Fraktion), in den HDL2 und HDL3 bestimmt (72). Das LDL-Cholesterin wurde als Differenz der Cholesterinwerte vor und nach der Präzipitation mit Natriumphosphorwolframat und Magnesiumchlorid in der  $d > 1,006$  g/ml-Fraktion berechnet. Der Triglyzeridgehalt wurde sowohl im Serum als auch in den VLDL bestimmt.

Die Auftrennung der Serumlipoproteine wurde mit der präparativen Ultrazentrifugation nach der Methode von Havel et al. (72) (unter Verwendung der Schneidetechnik durchgeführt). VLDL wurden bei einer Dichte von  $1,006$  g/ml aus der obersten Fraktion ( $d < 1,006$  g/ml) gewonnen. LDL und HDL wurden in der unteren Fraktion ( $d > 1,006$  g/ml) durch Präzipitation der LDL voneinander getrennt. HDL2 und HDL3 wurden durch Ultrazentrifugation der unteren Fraktion nach Präzipitation bei einer Dichte von  $d = 1,125$  g/ml voneinander getrennt.

HDL2 ( $d < 1,125$  g/ml) wurden aus der oberen, HDL3 ( $d > 1,125$  g/ml) wurden aus der unteren Fraktion gewonnen. Die Messung der Serumkonzentrationen von Apolipoprotein B, A-I und A-II erfolgte mittels der Raketennimmunelektrophorese-Technik nach Laurell (85). Die Apolipoproteine C und E wurden mittels der Harnstoff-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Kane et al. (78,79) bestimmt. Die Fettsäurezusammensetzung der Serumcholesterinester wurde gaschromatographisch nach der Methode von Morrisett et al. (98) analysiert.

#### 2.7.6. Statistik

-----

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Signifikanzen wurden mit dem parameterfreien Wilkoxon-Rangtest (ungepaarte oder gepaarte Testung) unter Verwendung der Geigy-Tabellen berechnet. Für die Erstellung von Korrelationen wurde der Spearman-Koeffizient errechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensubstrat-Methode

##### 3.1.1. Vergleich der Sensitivität der Cholesterinbestimmungs-Methoden

###### Originalansätze:

|               |   |       |              |             |
|---------------|---|-------|--------------|-------------|
| 1. Akanuma    | : | 200µl | Probe/3000µl | Farbreagenz |
| 2. Merk       | : | 10µl  | Probe/2000µl | Farbreagenz |
| 3. Boehringer | : | 20µl  | Probe/2520µl | Farbreagenz |

| Cholesterin-Konz.<br>(mg/dl) | Akanuma<br>(E) | Merck<br>(E) | Boehringer<br>(E) |
|------------------------------|----------------|--------------|-------------------|
| 10                           | 0.160          | 0.029        | 0.008             |
| 20                           | 0.310          | 0.060        | 0.015             |
| 30                           | 0.470          | 0.089        | 0.023             |
| 40                           | 0.620          | 0.119        | 0.030             |
| 50                           | 0.780          | 0.149        | 0.038             |
| 60                           | 0.930          | 0.180        | 0.046             |
| 70                           | 1.090          | 0.209        | 0.053             |
| 80                           | 1.240          | 0.238        | 0.062             |

Alle drei Assay-Systeme zeigten bis zu der untersuchten Cholesterinkonzentration von 80mg/dl eine lineare Extinktionszunahme. Die Sensitivität des von Akanuma et al. (100) vorgeschlagenen Assays lag deutlich über der Sensitivität der Originalansätze der Kits von Merk und Boehringer (5-fach bzw. 20-fach). Der Assay nach Akanuma war jedoch aufgrund der Instabilität der Farbreagenzlösung vergleichsweise wenig praktikabel. Von den gebrauchsfertig zur Verfügung stehenden Cholesterin-Bestimmungs-Kits wurde deshalb aufgrund seiner höheren Sensitivität die CHOD-Jodid-Methode (Merk) ausgewählt.

Die Sensitivität der enzymatischen Cholesterinbestimmungs-Methode steigt mit zunehmendem  $\Delta E/\Delta UC$ . Der UC-Umsatz durch die

LCAT ist bei 40 Minuten Inkubationszeit mit 1-8mg/dl (26-208 nmol/ml) relativ gering. Ein E von 0.005 - 0.010, das als Meßungenauigkeit z.B. infolge unterschiedlicher Pipettiervorgänge zu erwarten ist, sollte einen Variationskoeffizienten des LCAT-Assays zur Folge haben, der bei mittlerer LCAT-Aktivität 10% nicht überschreitet. Nach den Angaben der Fa. Merk ist die Farbreaktion linear bis zu einer Cholesterin-Konzentration von 500mg/dl. Diese Angabe ist bezogen auf die Messung des Gesamtcholesterins im Serum bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 10 $\mu$ l /2000 $\mu$ l. Einer Gesamtcholesterin-Konzentration von 500mg/dl entspricht bei diesem Ansatz ein Extinktionswert von 1.488. Da das unveresterte Cholesterin im Serum nur 30-40% des Serumgesamtcholesterins ausmacht, konnte das Probe/Reagenz-Verhältnis für die UC-Bestimmung gesteigert werden. Für die routinemäßigen UC-Messungen wurde folgendes Probe/Reagenz-Verhältnis ausgewählt:

1. 50 $\mu$ l / 2000 $\mu$ l (Farbreaktion linear bis UC=100mg/dl).
2. 50 $\mu$ l / 1000 $\mu$ l (Farbreaktion linear bis UC= 50mg/dl).

### 3.1.2. CHOD-Jodid-Methode: Sensitivitätssteigerung

-----  
durch Modifikation des Probe/Reagenz-Quotienten  
-----

Die folgende Untersuchung erlaubt den Vergleich des modifizierten Cholesterin-Bestimmungs-Assays mit dem Originalansatz der CHOD-Jodid-Methode (Merk).

#### Versuchsaufbau:

Messung und Vergleich der Extinktionswerte bei gleichen Cholesterin-Konzentrationen und ansteigenden Probe/Reagenz-Verhältnissen: 10 $\mu$ l/2000 $\mu$ l, 50 $\mu$ l/2000 $\mu$ l, 50/1000 $\mu$ l.

Als Cholesterin-Standard diente Preciset (Boehringer), das mit 50mM Tris/HCl-Puffer pH 7,4 verdünnt und auf entsprechende Cholesterin-Konzentrationsstufen (10-80mg/dl) eingestellt wurde.

| Cholesterin<br>(mg/dl) | Probe/Reaegnz<br>10 $\mu$ l/2000 $\mu$ l | Probe/Reagenz<br>50 $\mu$ l/2000 $\mu$ l | Probe/Reagenz<br>50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l |
|------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 5                      | 0.014                                    | 0.081                                    | 0.162                                    |
| 10                     | 0.029                                    | 0.164                                    | 0.320                                    |
| 20                     | 0.060                                    | 0.311                                    | 0.615                                    |
| 40                     | 0.119                                    | 0.638                                    | 1.250                                    |
| 50                     | 0.149                                    | 0.782                                    | 1.556                                    |
| 60                     | 0.180                                    | 0.950                                    |                                          |
| 80                     | 0.238                                    | 1.262                                    |                                          |

-----

Die Cholesterin-Konzentration/Extinktions-Beziehung war bei allen drei Probe/Reagenz-Verhältnissen linear. Unter den genannten Versuchsbedingungen wurde bei Erhöhung des Probe/Reagenz-Verhältnisses keine signifikante Abnahme des Korrelationskoeffizienten gefunden.

Ein Probe/Reagenz-Verhältnis von 50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l wurde nur verwendet bei Cholesterin-Konzentrationen, die unter 50mg/dl lagen. Bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50 $\mu$ l/2000 $\mu$ l wurden Extinktionswerte erreicht, die denen der Akanuma-Methode entsprachen (100). Cholesterin-Konzentrationen von 5mg/dl führten bei beiden Methoden zu einer Extinktionsänderung von 0.080.

### 3.1.3. Zuverlässigkeit der enzymatischen Cholesterin- ----- Bestimmung mit Hilfe der CHOD-Jodid-Methode -----

30 Parallelproben eines Serumpenders wurden gleichzeitig auf die Konzentration des unveresterten Cholesterins im Serum untersucht. Bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l und einer mittleren Cholesterin-Konzentration von 31mg/dl wurde ein Variationskoeffizient von 0,6% ermittelt (n=30, MW=31mg/dl, SD=0.18mg/dl).

### 3.1.4. Zuverlässigkeit der LCAT-Aktivitätsmessung -----

#### 1. Within day Untersuchung:

15 Doppelbestimmungen der LCAT-Aktivität im Serum eines Serumpenders wurden parallel an einem Tag durchgeführt. Bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l und einer mittleren molaren LCAT-Aktivität von 114nmol/mlxh wurde ein Variationskoeffizient von 3,3% erzielt (n=15, MW=114nmol/mlxh, SD=3,8nmol/mlxh).

#### 2. Different day Untersuchung:

16 Doppelbestimmungen der LCAT-Aktivität im Serum eines Serumpenders wurden an 16 verschiedenen Tagen durchgeführt. Die dazu verwandten Serumproben wurden bei -20°C aufbewahrt und jeweils kurz vor dem Assay aufgetaut. Bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l ergab sich bei einer mittleren LCAT-Aktivität von 99,3nmol/mlxh ein Variationskoeffizient von 4,3% (n=16, MW=99,3nmol/mlxh, SD=4,3nmol/mlxh).

3.1.5. 2-Mercaptoäthanol: Inhibitorische Wirkung auf die  
Farbreaktion bei der enzymatischen Cholesterinbestimmung

2-Mercaptoäthanol wird zur Stabilisierung des LCAT-Enzyms gegen eine mögliche Oxidation der funktionell wichtigen Sulfhydryl-Gruppen in einer Konzentration von 4mM eingesetzt. LCAT-Enzympräparationen verlieren ohne dieses Antioxidans schnell an Aktivität.

Die Fragestellung der Untersuchung war, ob und in welchen Konzentrationen 2-Mercaptoäthanol (Serva 28625) den enzymatischen Cholesterin-Testansatz hemmt.

Dazu wurden Proben gleicher Cholesterin-Konzentration und ansteigender 2-Mercaptoäthanol-Konzentration (0-8mM) hergestellt und bezüglich ihrer Extinktionswerte im CHOD-Jo-did-Assay untersucht.

Ergebnisse:

| Mercaptoäthanol-Konzentration<br>in der Probe (mM) | Extinktion |
|----------------------------------------------------|------------|
| 0                                                  | 0.720      |
| 1.0                                                | 0.424      |
| 2.0                                                | 0.084      |
| 3.0                                                | 0.000      |
| 4.0                                                | 0.000      |

2-Mercaptoäthanol inhibiert die Cholesterin-Oxidase und macht damit die Cholesterin-Bestimmung in dem enzymatischen Cholesterin-Testansatz unmöglich.

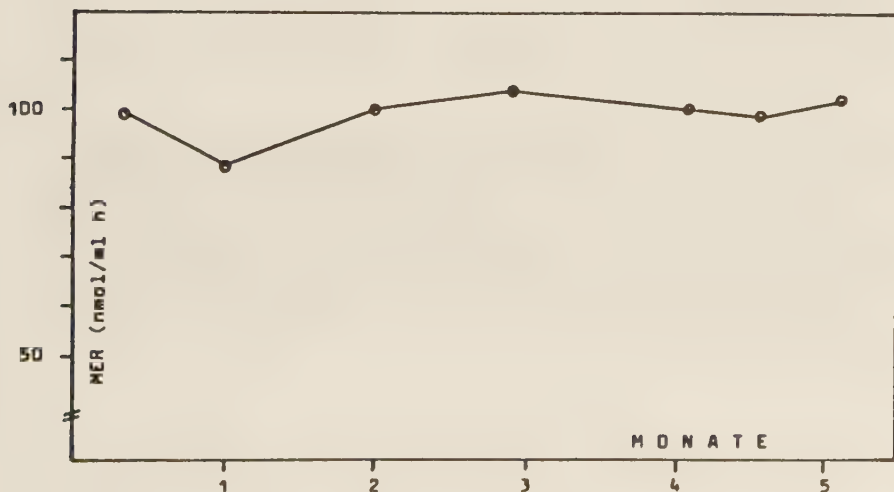
### 3.1.6. Stabilität der LCAT-Enzymaktivität

---

Reaktionsbedingungen: Serumproben eines Spenders wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. In einem Zeitraum von 153 Tagen (etwa 5 Monate) wurde die LCAT-Aktivität wiederholt bestimmt.

| Zeit (Tage)     | 0  | 10 | 29 | 60  | 87  | 122 | 137 | 153 |
|-----------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MER (nmol/mlxh) | 99 | 99 | 89 | 100 | 104 | 100 | 99  | 102 |

Ergebnisse: Über einen Zeitraum von 5 Monaten blieb die Enzym-Aktivität der bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Serumproben unverändert.



### 3.1.7. Inhibition der LCAT-Reaktion durch das Farbreagensz des CHOD-Jodid-Kits

Das Farbreagensz des CHOD-Jodid-Kits enthält ein Detergenz, das Cholesterin aus dem Lipoprotein-Komplex herauslöst und damit für die Cholesterin-Oxidase zugänglich macht. Dieses Detergenz, ein Polyäthylenglykolmonoester wirkt inhibitorisch auf die LCAT-Reaktion.

Die Fragestellung der Untersuchung war, ob und bei welchem Probe/Reagensz-Verhältnis ein Stillstand der LCAT-Reaktion erreicht wird. Diese Frage war deshalb von Interesse, weil sichergestellt werden sollte, daß während des Cholesterin-Bestimmungs-Assays keine weitere Cholesterin-Veresterung erfolgte.

Reaktionsbedingungen: Die Farbreagenszlösung des CHOD-Jodid-Kits (ohne Oxidase) wurde stufenweise mit 50mM Tris/HCl-Puffer pH 7,4 verdünnt. 120µl der Farbreagensz-Verdünnungsstufen wurden zu 400µl der Serumprobe hinzugegeben. Nach Inkubation bei 37°C über 40 Minuten wurde die LCAT-Aktivität gemessen.

| Farbreagensz<br>(µl/400µl Probe) | 0  | 17 | 33 | 50 | 67 | 83 | 100 | 120 |
|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| MER (nmol/mlxh)                  | 91 | 70 | 65 | 55 | 34 | 29 | 18  | 5   |

Ergebnisse: Mit steigender Konzentration der Farbreagenszlösung im Assay kommt es zu einer zunehmenden Inhibition der LCAT-Aktivität. Bei einem Probe/Farbreagensz-Verhältnis von 120µl/400µl ist keine signifikante LCAT-Aktivität mehr nachweisbar. Das üblicherweise verwendete Farbreagensz/Probe-Verhältnis liegt bei 2000µl/50/µl bzw. 1000µl/50µl.

Für die Zeit der Cholesterin-Bestimmung ist also keine zusätzliche Inaktivierung der LCAT notwendig. Die LCAT Inhibition wird vollständig durch das im Farbreagensz enthaltene Detergenz erreicht.

### 3.1.8. Temperaturabhängigkeit der LCAT-Reaktion

---

Die Untersuchung wurde durchgeführt mit dem Ziel, einerseits um den Grad der Temperaturabhängigkeit zu messen und andererseits um die Inaktivierung der LCAT nach Inkubation bei 56°C zu verifizieren.

Reaktionsbedingungen: 200µl Serum und 100µl Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen wurden 60 Minuten lang bei steigenden Temperaturen ( 4-60°C) inkubiert.

Ergebnisse: Die LCAT-Aktivität erreichte ein Maximum bei 40°C. Bei 37°C wurde diese Aktivität zu 91% erreicht; bei 30°C zu 54%, bei 24°C, also Raumtemperatur, zu 1,3%. Bei 4°C, also Kühlschrank-Temperatur, wurde keine LCAT-Aktivität mehr nachgewiesen.

### 3.1.9. Einfluß des pH auf die LCAT-Aktivität

---

Der Einfluß des pH auf die LCAT-Aktivität ist in der Literatur umstritten. Die entsprechenden Angaben für einen optimalen pH schwanken zwischen pH 6 und pH 8.

Reaktionsbedingungen: Der pH der Serumprobe wurde mittels NaOH bzw. HCl eingestellt und mit einer Mikroelektrode in den 250µl Serumproben überprüft.

Ergebnisse: Die LCAT-Aktivität erreichte ein Maximum bei einem pH zwischen 7,65 und 7,85. Bei pH 9,25 wurden 37% der maximalen Aktivität gefunden, bei pH 5,95 waren 26%, bei pH 5,10 war keine LCAT-Aktivität mehr nachweisbar.

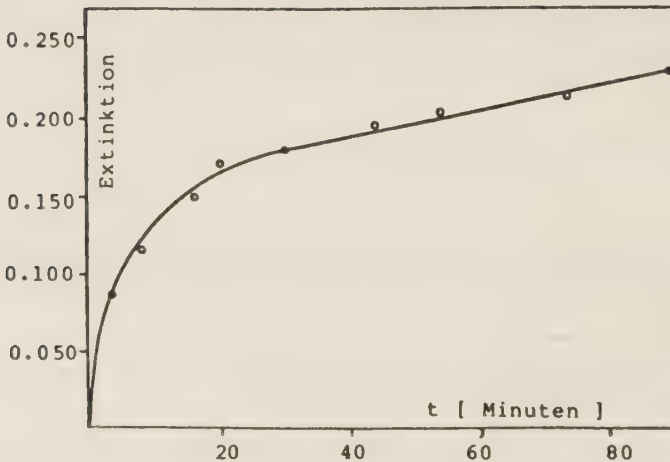
### 3.1.10. Eigenschaften der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen

---

#### 3.1.10.1. Metastabilität der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen

---

Die Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen sind metastabil. Mit zunehmendem Zeitabstand zur Ultraschall-Behandlung kommt es in zunehmendem Maße zu Trübungen der Liposomen-Präparation und schließlich zum Ausfallen der Lipide. Die Trübung der Liposomen-Präparation war photometrisch bei 546nm meßbar. Die Untersuchung galt der Frage der Kinetik der Liposomen-Desintegration.



#### Ergebnisse:

Die Extinktionszunahme d.h. die Trübungszunahme der Liposomen-Präparation war innerhalb der ersten 20 Minuten nach Abschluß der Ultraschall-Behandlung exponentiell und ging dann in eine lineare Phase geringer Extinktionszunahme über.

### 3.1.10.2. Einfluß der Metastabilität der Liposomen auf die LCAT-Aktivierung

In Abetracht der photometrisch nachgewiesenen Instabilität der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen erschien es notwendig, zu überprüfen, ob die Veränderung der Liposomen innerhalb der ersten 50 Minuten nach Abschluß der Ultraschallbehandlung eine Veränderung der LCAT-Aktivierung zur Folge hat.

#### Reaktionsbedingungen:

300µl Serum und 150/µl Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen-Lösung wurden 60 Minuten lang inkubiert. Die LCAT wurde aktiviert durch Liposomen-Präparationen, die in zunehmenden Zeitabständen ( 6-50 Minuten nach Ultraschallbehandlung ) zum Assay hinzugefügt wurden.

| Zeit (Min.)                   | 0  | 6  | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | 79 | 74 | 87 | 87 | 87 | 79 | 79 |

#### Ergebnisse:

Innerhalb der ersten 50 Minuten nach Abschluß der Ultraschallbehandlung änderte sich der Aktivierungsgrad der LCAT nicht. (CV = 6.06%)

### 3.1.10.3. Reproduzierbarkeit der LCAT-Aktivität durch Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen

Die Untersuchung galt der Frage der Reproduzierbarkeit der LCAT-Aktivierung durch Liposomen-Präparationen, die an vier verschiedenen Tagen angefertigt worden waren.

Reaktionsbedingungen: Inkubation von 200µl Serumprobe eines Spenders mit 100µl der Liposomen-Lösung über 60 Minuten.

| Zeit (Tage)                   | 1   | 2   | 3   | 4   |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | 166 | 181 | 179 | 179 |

#### Ergebnisse:

Die an vier verschiedenen Tagen angefertigten Liposomen-Präparationen erbrachten eine annähernd gleiche LCAT-Aktivierung. (CV = 3.9%)

3.1.10.4. Einfluß der Beschallungsdauer auf die Qualität  
-----  
der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen  
-----

Die Auswirkung fortgesetzter Ultraschallbehandlung der Liposomen auf die LCAT-Aktivierung wurde untersucht. Dazu wurden Liposomen-Präparationen verwendet, die sich durch zunehmende Beschallungsexposition unterschieden.

Reaktionsbedingungen: 300µl Serumprobe und 150µl Liposomen wurden 60Minuten lang inkubiert.

| Beschallungszeit<br>(Minuten) | 6.0 | 7.5 | 9.0 | 10.5 | 12.0 | 13.5 | 18,5 |
|-------------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | 109 | 104 | 112 | 114  | 104  | 114  | 112  |

Ergebnisse:

Eine wesentliche Beeinflussung der LCAT-Aktivierung bei Verwendung unterschiedlich lang beschallter Liposomen-Präparationen konnte nicht nachgewiesen werden. (CV = 3.9%)

### 3.1.11. Funktion der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen im LCAT-Assay

#### 3.1.11.1. LCAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentration im Lecithin-Sol

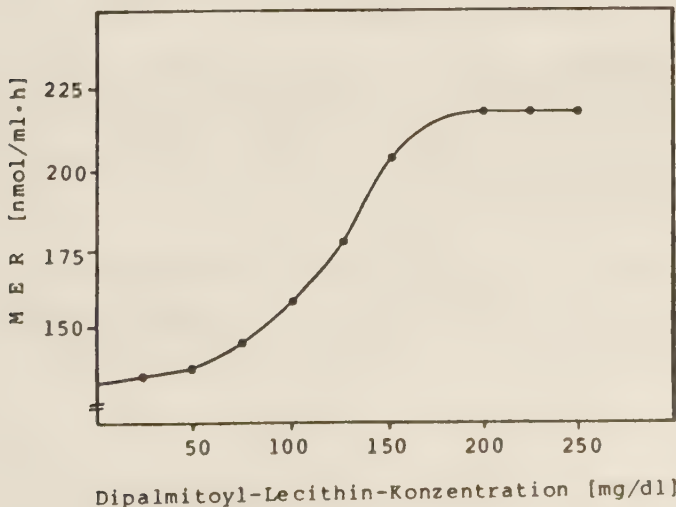
Die Untersuchung galt der Frage, bei welcher Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentration eine optimale und reproduzierbare LCAT-Aktivierung erreicht werden kann. Im Assay nach Aka-numa et al. (100) wurde eine Lecithin-Konzentration von 250mg/dl angegeben.

Reaktionsbedingungen: 100µl Liposomen mit steigender Lecithin-Konzentration (0-250mg/dl) wurden mit 200µl Serumprobe 60 Minuten lang inkubiert.

| Lecithin-Konz.<br>(mg/dl)     | 0   | 25  | 50  | 75  | 100 | 125 | 150 | 200 | 225 | 250 |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | 133 | 136 | 138 | 146 | 159 | 178 | 205 | 218 | 218 | 210 |

#### Ergebnisse:

Ein Plateau der LCAT-Aktivität bildete sich bei einer Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentration von 200mg/dl in der Liposomenpräparation. Die routinemäßige Verwendung einer Lecithin-Konzentration von 250mg/dl wurde nach dem Gesichtspunkt eines größeren Sicherheitsbereiches der LCAT-Aktivierung und damit einer besseren Reproduzierbarkeit der Meßwerte übernommen.



### 3.1.11.2. Linearitätsdauer der LCAT-Reaktion ohne Stimulation durch Dipalmitoyl-Lecithin

Die initiale, lineare Reaktionsphase der LCAT dauert nach Angaben der Literatur (100) 30-40 Minuten. Um einen Vergleich herzustellen zwischen Lecithin-stimulierten und nicht stimulierten Proben, wurde die Linearitätsdauer der initialen LCAT-Reaktion bei nicht stimulierten Serumproben untersucht.

Reaktionsbedingungen: Neun 200 $\mu$ l Serumproben eines Serumspenders wurden 15-120 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

| Zeit (Minuten)                | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90  | 105 | 120 |
|-------------------------------|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | - | 19 | 38 | 60 | 74 | 90 | 105 | 108 | 177 |

#### Ergebnisse:

In der nativen, nicht stimulierten Serumprobe blieb die LCAT-Reaktion über 40 Minuten linear.

### 3.1.11.3. Linearitätsverlängerung der initialen LCAT-Reaktion bei Stimulation durch Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen

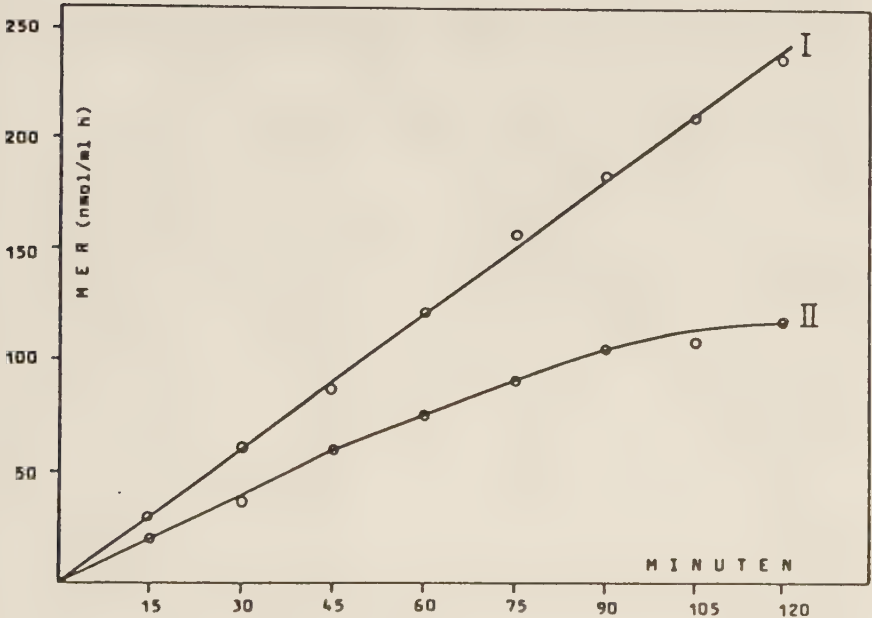
Das Ziel der Untersuchung bestand in der Frage der Dauer der Lecithin-induzierten Linearitätsverlängerung. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die Linearitätsverlängerung abhängig ist von den Konzentrationen des unveresterten Cholesterins im Serum.

Reaktionsbedingungen: 200 $\mu$ l Serum und 100 $\mu$ l Liposomen wurden 0-120 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Zur Untersuchung kamen sieben Serumproben verschiedener Spender, die Serumkonzentrationen an unverestertem Cholesterin zwischen 30mg/dl und 100mg/dl aufwiesen. Die vorliegenden Meßdaten stehen repräsentativ für die Reaktionskinetik, die bei sieben Probanden untersucht wurden.

| Zeit (Minuten)                | 0 | 15 | 30 | 45 | 60  | 75  | 90  | 105 | 120 |
|-------------------------------|---|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| LCAT-Aktivität<br>(nmol/mlxh) | - | 24 | 61 | 85 | 122 | 157 | 183 | 209 | 237 |

### Ergebnisse:

Über einen Zeitraum von mindestens 120 Minuten blieb die LCAT-Reaktion bei den sieben untersuchten Serumproben linear. Die Linearität der LCAT-Reaktion über 120 Minuten stellt jedoch einen Grenzbereich dar. Aus Sicherheitsgründen und nicht zuletzt auch auf Grund der größeren Praktikabilität wurde die LCAT-Aktivität routinemäßig schon nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bestimmt.



I = stimulierte Probe (0-120 Minuten)  
 $y = 2,02x - 1,49$ ;  $r = 0,99$ ;

II = nicht stimulierte Probe (0-45 Minuten)  
 $y = 1,3x - 0,6$ ;  $r = 0,99$ ;

3.1.11.4. Phasenspezifität der LCAT-Aktivierung durch  
-----  
durch Dipalmitoyl-Lecithin  
-----

Die Fragestellung der Untersuchung war, ob es eine Phasenspezifität der LCAT-Stimulation durch Dipalmitoyl-Lecithin gibt. Aus den Angaben von Akanuma et al. (100) geht nicht hervor, ob Dipalmitoyl-Lecithin die LCAT-Aktivität in der initialen oder/und den darauf folgenden Reaktionsphasen (109) stimuliert. Unklar war außerdem, ob Dipalmitoyl-Lecithin eine LCAT-Aktivitätssteigerung an sich oder lediglich eine Verlängerung der initialen, linearen Reaktionsphase zur Folge hat.

Reaktionsbedingungen: In dem LCAT-Assay aus 200µl Serum und 100µl Liposomen wurden Liposomen-Präparationen mit steigender Lecithin-Konzentration verwendet (0-250mg/dl).

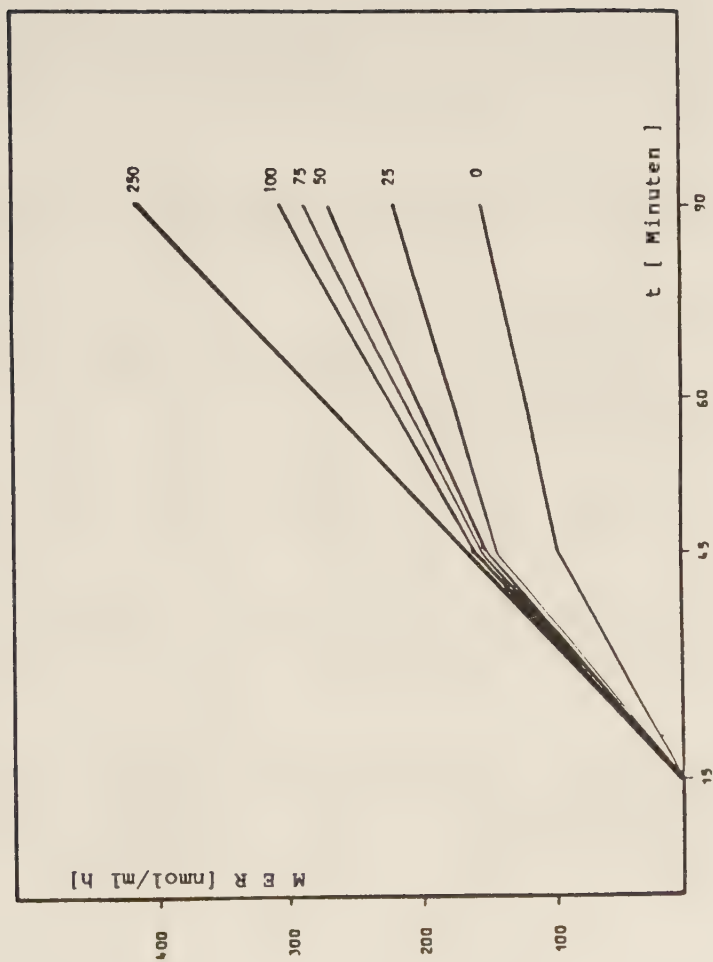
Zwei Phasen der LCAT-Reaktion wurden untersucht:

1. Die lineare Phase : 15-45 Minuten;
2. Die nicht lineare Phase : 45-90 Minuten;

|                           | Phase I<br>15-45 Min. | Phase II<br>45-90 Min. | Phase I+II<br>15-90 Min. |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Lecithin-Konz.<br>(mg/dl) | MER<br>(nmol/mlxh)    | MER<br>(nmol/mlxh)     | MER<br>(nmol/mlxh)       |
| 0                         | 100                   | 54                     | 154                      |
| 25                        | 148                   | 72                     | 220                      |
| 50                        | 152                   | 167                    | 269                      |
| 75                        | 161                   | 128                    | 289                      |
| 100                       | 163                   | 143                    | 306                      |
| 250                       | 169                   | 241                    | 410                      |

-----  
Ergebnisse:  
-----

1. Dipalmitoyl-Lecithin steigert die LCAT-Aktivität in der initialen Phase I (15-45 Minuten).
2. Dipalmitoyl-Lecithin verlängert die Linearität der initialen Veresterungsrate
3. Der LCAT-Aktivitäts-steigernde Effekt von Dipalmitoyl-Lecithin ist in der Phase II (45-90 Minuten) deutlich größer als in der Phase I (346%).



3.1.11.5. Vergleich der LCAT-Aktivität in Dipalmitoyl-  
Lecithin stimulierten und nicht stimulierten Serumpro-  
ben (n = 27)

Serumproben von 27 Spendern wurden mit und ohne Stimu-  
lierung der LCAT durch Dipalmitoyl-Lecithin untersucht.

Ergebnisse:

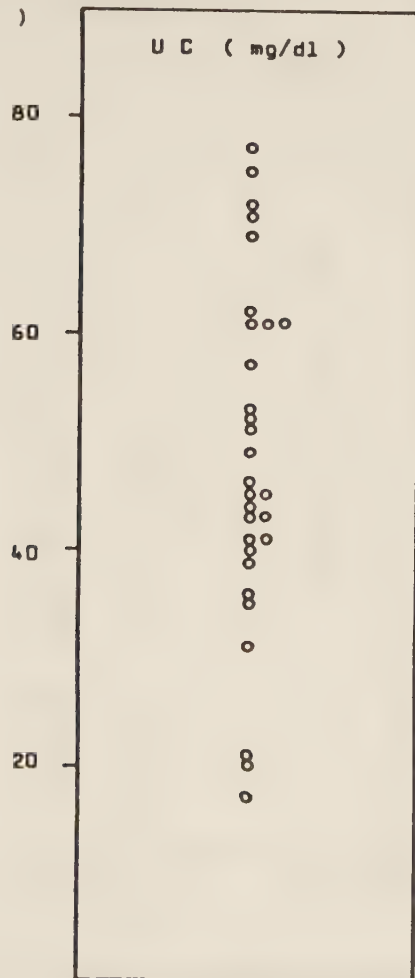
1. Unverestertes Cholesterin:  
Mittelwert  $\pm$  SD = 48,6  $\pm$  15,9 mg/dl; CV = 33%;
2. Fraktionelle LCAT-Aktivität:
  - a. stimulierte Proben  
Mittelwert  $\pm$  SD = 7,6  $\pm$  2,7 %/h ; CV = 36%;
  - b. nicht stimulierte Proben  
Mittelwert  $\pm$  SD = 3,3  $\pm$  1,75 %/h ; CV = 53%;
3. Molare LCAT-Aktivität
  - a. stimulierte Proben  
Mittelwert  $\pm$  SD = 97,4  $\pm$  42,9 nmol/mlxh  
CV = 44%;
  - b. nicht stimulierte Proben  
Mittelwert  $\pm$  SD = 43,3  $\pm$  29,9 nmol/mlxh  
CV = 69%;

Die fraktionelle LCAT-Aktivität der nicht stimulierten Proben lag um durchschnittlich 57% niedriger als die der stimulierten Proben.

Die molare LCAT-Aktivität lag um durchschnittlich 56% niedriger.

Konzentration des unveresterten Cholesterins im Serum

( n = 27 )

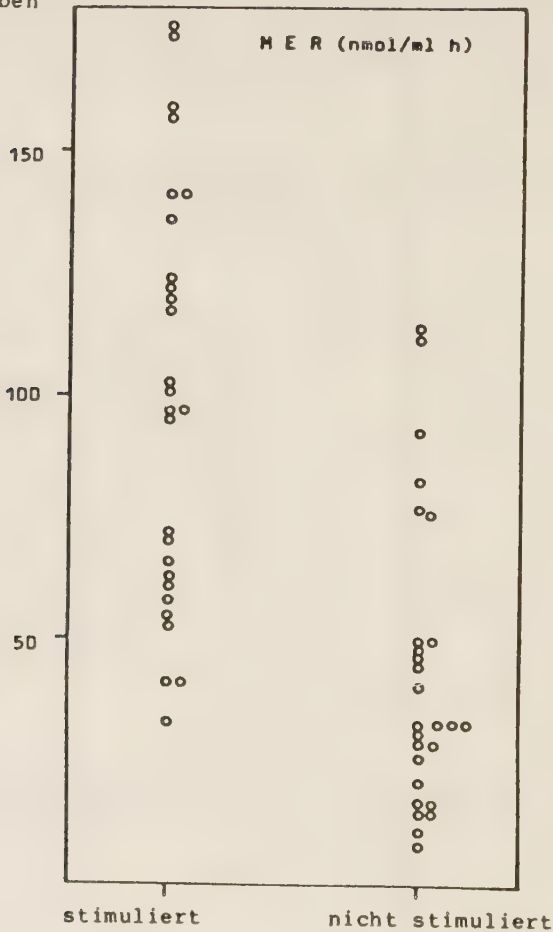


Mittelwert (+/-SD): 48,6 +/- 15,9mg/dl; CV = 33%

Molare LCAT-Aktivität im Serum

(n = 27)

Vergleich Lecithin-stimulierter und nicht stimulierter Serumproben

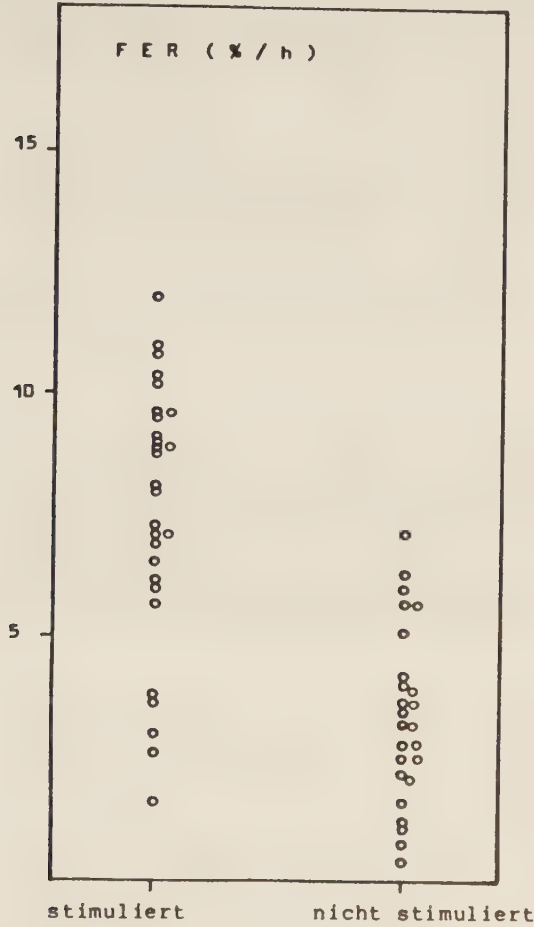


Stimulierte Proben: Mittelwert (+/-SD): 97,4 +/- 42,9 nmol/ml h;  
nicht stim. Proben: Mittelwert (+/-SD): 43,3 +/- 29,9 nmol/ml h;  
CV der stim. Proben: 44%;  
CV der nicht stim. Proben: 69%;

# Fraktionelle LCAT-Aktivität im Serum

(n = 27)

Vergleich der Lecithin-stimulierten und der nicht stimulierten Serumproben.



Stimulierte Proben: Mittelwert (+/-SD): 7,5 +/- 2,70/h; CV = 36%

Nicht stim. Proben: Mittelwert (+/-SD): 3,3 +/- 1,750/h; CV = 53%

### 3.1.12 Substrateigenschaften des hitzeinaktivierten

#### Serums in der LCAT-Reaktion

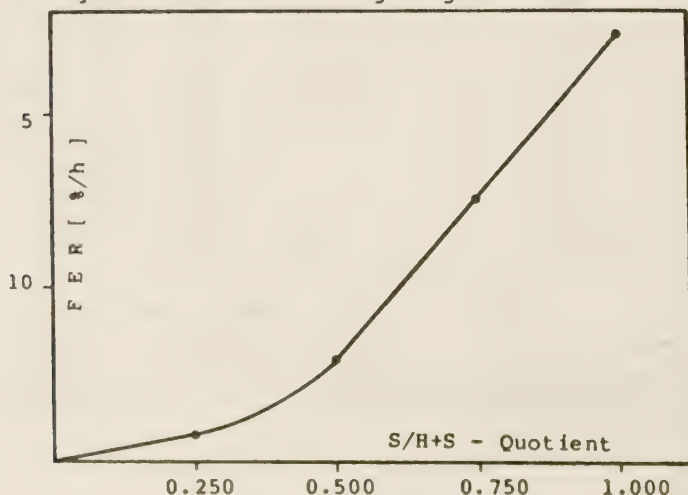
Die vorliegende Untersuchung galt der Analyse der Substrateigenschaften hitzeinaktivierten Serums. Nach Glomset et al. (62) sowie nach eigenen Untersuchungen wird das LCAT-Enzym nach einer 30 Minuten langen Serum-Inkubation bei 56-60°C vollständig und irreversibel inaktiviert. Von besonderem Interesse war die Frage, ob hitzeinaktiviertes Serum als standardisierbares Substrat in der LCAT-Reaktion eingesetzt werden kann.

Reaktionsbedingungen: Sieben Serumproben (S) des selben Spenders wurden durch schrittweise Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum (H) nämlichen Spenders verdünnt. Dabei wurden S/H+S-Quotienten zwischen 0 und 1,0 eingestellt.

| S            | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 | 0.750 | 1.00 |
|--------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| H+S          |   |       |       |       |       |       |      |
| FER<br>(%/h) | - | 0.4   | 0.8   | 1.9   | 2.9   | 7.5   | 12.3 |

#### Ergebnisse:

Die Beziehung der fraktionellen LCAT-Rate an dem S/H+S-Quotienten war nur bis zu einem S/H+S-Quotienten von 0.5 linear. Bei niedrigerem S/H+S-Quotienten war infolge des größeren Anteiles an hitzeinaktiviertem Substrat (möglicherweise auf Grund partieller Substrat-Denaturierung) die Enzymaktivität deutlich geringer.



### 3.1.13. LCAT-Normwerte bei 54 männlichen und weiblichen Probanden

---

Die Normalwerte der LCAT im Assay nach Akanuma (100) wurden untersucht anhand von 44 männlichen und 10 weiblichen Probanden, die alle klinisch gesund waren und keine Fettstoffwechselstörung aufwiesen.

#### Ergebnisse:

---

1. Unverestertes Cholesterin im Serum:  
Mittelwert  $\pm$  SD = 46  $\pm$  14 mg/dl; CV = 30%;
2. Fraktionelle LCAT-Aktivität:  
Mittelwert  $\pm$  SD = 9,2  $\pm$  4,1 %/h; CV = 45%;
3. Molare LCAT-Aktivität  
Mittelwert  $\pm$  SD = 113  $\pm$  52 nmol/mlxh; CV = 46%;
4. Ein signifikanter Geschlechtsunterschied war bei den untersuchten Parametern nicht nachweisbar (das unveresterte Cholesterin der weiblichen Probanden lag bei 45,1  $\pm$  10,7 mg/dl, die fraktionelle LCAT-Rate bei 11,1  $\pm$  5,4 %/h, die molare LCAT-Aktivität bei 113  $\pm$  10,7 nmol/ml h).

### 3.2. Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsubstrat-Methode

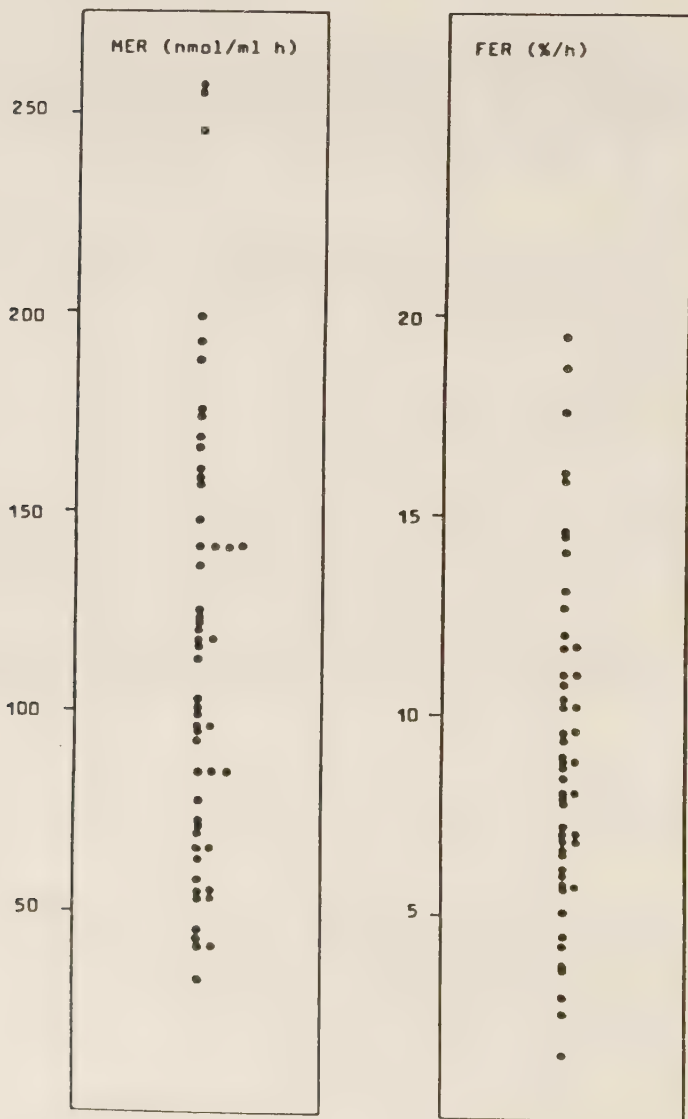
---

#### 3.2.1. Präzision der LCAT-Aktivitätsbestimmung im Über- stand nach Lipoproteinpräzipitation

---

Die Zuverlässigkeit des Fremdsubstrat-Assays nach Bartholomé et al.(18) wurde anhand von 15 Parallelproben eines Serumspenders an einem Tag untersucht. Bei einer molaren LCAT-Rate von 98nmol/mlxh ergab sich ein Variationskoeffizient von 7,1%.  
(n = 15, MW $\pm$ -SD = 98  $\pm$  7 nmol/mlxh)

Molare und fraktionelle LCAT-Aktivität bei 54 Normal-  
Probanden



3.2.2. Apolipoprotein A-I Konzentration im Überstand  
-----  
nach Lipoproteinpräzipitation  
-----

In drei verschiedenen Serumproben normolipidämischer Spender wurde vor und nach der Fällungsreaktion (NaPW 1.02% , MgCl<sub>2</sub> 0,18M) die Apolipoprotein A-I Konzentration nephelometrisch bestimmt.

| Proben-Nr. | Apolipoprotein A-I Konzentration (mg/dl) |                  |
|------------|------------------------------------------|------------------|
|            | vor der Fällung                          | nach der Fällung |
| 1          | 141                                      | 81               |
| 2          | 138                                      | 78               |
| 3          | 172                                      | 98               |

Ergebnisse:  
-----

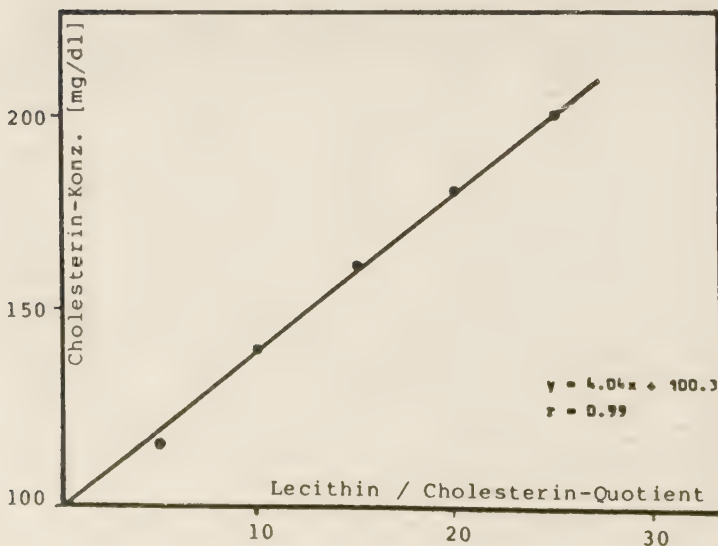
Nach der Fällungsreaktion verblieben durchschnittlich 57% des vor der Fällung gemessenen Apolipoprotein A-I im Überstand. Diese Apolipoprotein A-I Konzentration reicht aus für eine vollständige Aufrechterhaltung der LCAT-Aktivität.

### 3.2.3. Cholesterin-Konzentrationen bei Liposomen, die aus Dilineoyl-Lecithin und Cholesterin bei steigendem Lecithin/Cholesterin-Quotienten hergestellt wurden

Das molare Verhältnis von Lecithin zu Cholesterin wurde bei konstanter Cholesterin-Konzentration zugunsten des Lecithins vermindert. Nach Herstellung und chromatographischer Reinigung der Liposomen wurde die Cholesterin-Konzentration gemessen.

| mol. Ratio<br>Lecithin/Cholesterin | 5   | 10  | 15  | 20  | 25  |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cholesterin-Konzentration (mg/dl)  | 120 | 140 | 162 | 181 | 201 |

Die Zunahme der Cholesterin-Konzentration ist bei steigendem Lecithin/Cholesterin-Quotienten linear ( $r=0.99$ ,  $y=4,04 + 100,3$ ). Mit steigendem Lecithingehalt kann offenbar in zunehmendem Maße Cholesterin in die Liposomen aufgenommen werden. Das nicht durch die Liposomen inkorporierte Cholesterin geht bei der Reinigung der Liposomen verloren.



3.2.4. LCAT-Aktivität im Überstand in Abhängigkeit von  
 -----  
 der Lecithin -bzw. Cholesterin-Konzentration  
 -----

Die Untersuchung wurde mit dem Ziel durchgeführt, ein optimales Überstand/Liposomen-Verhältnis (Ü/L) zu definieren.

Reaktionsbedingungen: Zu 150µl Fällungsüberstand, 75µl 0.6M Natriumcitrat wurden steigende Volumina von Cholesterin/Dilinoeoyl-Lecithin-Liposomen gegeben (UC = 46mg/dl; PC/UC = 3.8:1,0).

| Liposomen<br>(µl/Ansatz) | Ü/L  | MER<br>(nmol/mlxh) | FER<br>(%/h) |
|--------------------------|------|--------------------|--------------|
| 25                       | 6.0  | 25                 | 10.0         |
| 50                       | 3.0  | 74                 | 11.4         |
| 75                       | 2.0  | 98                 | 8.9          |
| 100                      | 1.5  | 115                | 7.3          |
| 125                      | 1.2  | 139                | 7.4          |
| 150                      | 1.0  | 172                | 7.7          |
| 175                      | 0.86 | 180                | 6.6          |
| 200                      | 0.75 | 164                | 5.2          |

Ergebnisse: Bei einem Überstand/Liposomen-Verhältnis von Ü/L= 1:1 wurde ein Plateau der molaren LCAT-Aktivität erreicht. Die Beziehung der MER zum Ü/L-Quotienten blieb bis einem Ü/L-Wert von 1:1 linear.

### 3.2.5. Optimales Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Verhältnis

---

Die Abhängigkeit der LCAT-Aktivität vom PC/UC-Quotienten der Liposomen ist bekannt. Der für die LCAT-Aktivität optimale PC/UC-Quotient ist jedoch umstritten. Das Ziel der Untersuchung bestand darin, einem optimalen PC/UC-Quotienten für die LCAT-Reaktion im delipoproteinisierten Fällungsüberstand zu definieren.

Reaktionsbedingungen: Zu 200µl Fällungsüberstand wurden 100µl Liposomen mit unterschiedlichen PC/UC-Quotienten gegeben. Dabei wurde das PC/UC-Verhältnis von 3,02 auf 4,00 gesteigert.

| UC-Konzentration<br>(mg/dl) | PC/U<br>(mol/mol) | MER<br>(nmol/mlxh) | FER<br>(%/h) |
|-----------------------------|-------------------|--------------------|--------------|
| 31                          | 3.02              | 126                | 10.6         |
| 33                          | 3.07              | 131                | 10.3         |
| 36                          | 3.11              | 139                | 10.0         |
| 31                          | 3.80              | 142                | 12.0         |
| 33                          | 4.00              | 135                | 9.8          |

---

Ergebnisse: Maximale MER -und FER- Werte wurden bei einem PC/UC-Verhältnis von 3.8 erreicht.

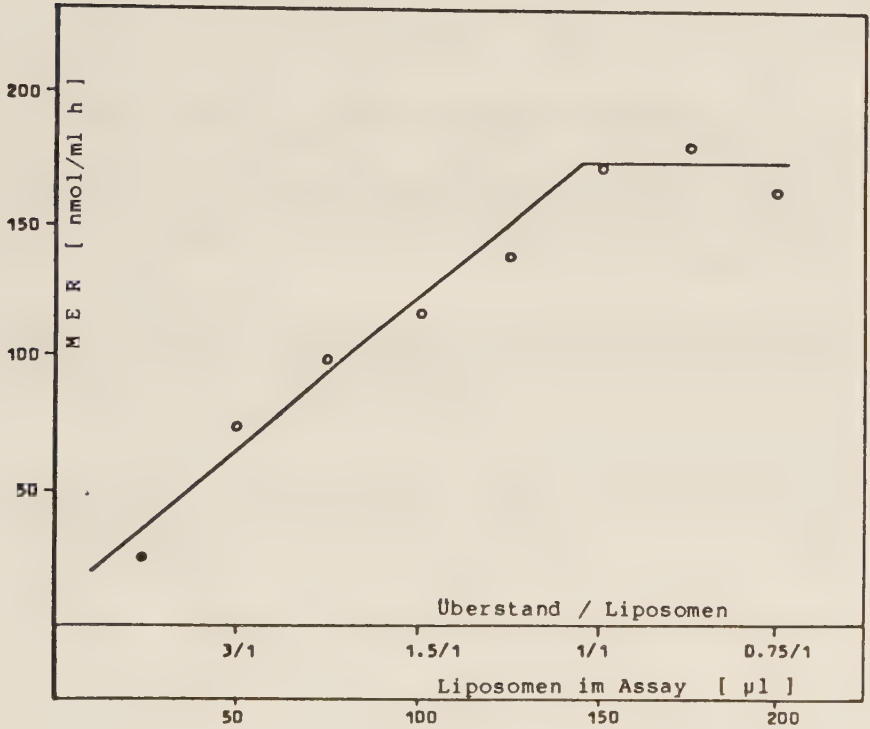
### 3.2.6. Linearität der initialen Veresterungsaktivität im Überstand nach Lipoprotein-Präzipitation

---

Das Ziel der Untersuchung war die Analyse der Linearitätsdauer der initialen LCAT-Reaktion im lipoproteinfreien Fällungsüberstand.

Reaktionsbedingungen: 1200µl delipoproteinisierter Fällungsüberstand und 1200µl Cholesterin/Dilineoyl-Lecithin-Liposomen wurden vereinigt und auf acht Eppendorfcups verteilt. Nach 0-105 Minuten langer Inkubation bei 37°C wurde die Konzentration des unveresterten Cholesterins bestimmt.

LCAT-Aktivität im Überstand in Abhängigkeit von der Lecithin  
bzw. der Cholesterin-Konzentration im Assay



| Zeit (Min.) | 0    | 15   | 30   | 45   | 60   | 75   | 90   | 105  |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| UC (mg/dl)  | 49.0 | 48.5 | 47.8 | 47.7 | 47,0 | 46,7 | 46,2 | 45,4 |

Ergebnisse: Über eine Inkubationszeit von 90 Minuten war der Cholesterinabfall linear. Entsprechend war auch die LCAT-Reaktion in diesem Zeitraum linear. Eine derartige Linearitätsverlängerung konnte durch Zugabe von Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen zu Vollserum nicht beobachtet werden.

### 3.2.7. Aktivitätsverlust der LCAT nach Lipoproteinfällung

Möglicherweise bedingt durch die hohen Ionenkonzentrationen im Fällungsüberstand ist die LCAT nach der Fällungsreaktion relativ instabil. Bewahrt man den Überstand auf bei 4°C, so kommt es in kurzer Zeit zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des LCAT-Enzyms.

Reaktionsbedingungen: Fünf Serumproben verschiedener Spender wurden direkt nach der Fällungsreaktion und 12 Stunden nach der Fällungsreaktion (Aufbewahrung bei 4°C) auf ihre LCAT-Aktivität hin untersucht. Die LCAT-Aktivität im Assay (200µl Überstand, 200µl Liposomen) wurde enzymatisch bestimmt.

| Überstand-Nr. | Molare LCAT-Aktivität (nmol / ml xh) |                             |
|---------------|--------------------------------------|-----------------------------|
|               | direkt nach der Fällung              | 12 Stunden nach der Fällung |
| 1             | 113                                  | 41                          |
| 2             | 126                                  | 36                          |
| 3             | 134                                  | 41                          |
| 4             | 141                                  | 26                          |
| 5             | 149                                  | 44                          |

Ergebnisse: Setzt man die unmittelbar nach der Fällungsreaktion gemessenen LCAT-Werte gleich 100%, so wurden 12 Stunden nach der Lipoproteinfällung noch durchschnittlich 28% der ursprünglichen LCAT-Aktivität gemessen.

### 3.2.8. Einfluß der Magnesiumchlorid-Konzentration auf die LCAT-Reaktion

Bei der Delipoproteinisierung der Serumprobe wird eine finale Magnesiumchlorid-Konzentration von 0.18M erreicht. Im Rahmen der Fällungsreaktion wird abhängig von der Lipoproteinzusammensetzung der überwiegende Anteil des eingesetzten Magnesiumchlorides präzipitiert.

Ziel der Untersuchung war die Bestimmung des Einflusses, den im Überstand verbleibendes Magnesiumchlorid auf die LCAT-Aktivität hat.

Reaktionsbedingungen: Zur Untersuchung kamen Serumproben des selben Spenders. Zu 200µl Serumprobe und 100µl Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen wurden 20µl Magnesiumchlorid-Lösung in steigender Konzentration hinzugegeben. In der folgenden Tabelle werden die finalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen im Assay angegeben.

| Magnesiumchlorid<br>(mM) | 0   | 12.5 | 31 | 44 | 63 | 94 | 125 | 182 |
|--------------------------|-----|------|----|----|----|----|-----|-----|
| MER (nmol/mlxh)          | 116 | 111  | 95 | 92 | 76 | 53 | 37  | --  |

Ergebnisse: Eine Magnesium-Konzentration von 0.182M im Assay führte zu einer vollständigen Inhibition der LCAT-Aktivität. Die Inhibition der LCAT-Aktivität erfolgte linear mit steigender Magnesium-Konzentration im Assay.

### 3.2.9. Einfluß von Natriumphosphorwolframat auf die LCAT Aktivität

Untersucht wurde die LCAT-Aktivität im Serum in Abhängigkeit von der NaPW-Konzentration.

Reaktionsbedingungen: Zu 200µl Serumprobe des selben Spenders und 100µl Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen wurden 20µl NaPW-Lösung in steigender finaler Konzentration (0-1,8%) hinzugegeben.

| NaPW (%)        | 0   | 0.12 | 0.63 | 0.93 | 1.25 | 1.80 |
|-----------------|-----|------|------|------|------|------|
| MER (nmol/mlxh) | 100 | 100  | 90   | 79   | 69   | 58   |

Ergebnisse: Bei einer NaPW-Konzentration von 1,8%, die der finalen NaPW-Konzentration im Fällungsansatz entsprach, konnten nur noch 58% der ursprünglichen LCAT-Aktivität gemessen werden. Die Inhibition der LCAT-Aktivität erfolgte linear mit steigender NaPW-Konzentration

### 3.2.10. Einfluß von Natriumcitrat auf die LCAT-Aktivität

-----

Untersucht wurde die LCAT-Aktivität im Serum in Abhängigkeit von der Natriumcitrat-Konzentration im Assay.

Reaktionsbedingungen: Zu 22µl Serumprobe des selben Spenders und 100µl Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen wurden 20µl Natriumcitrat-Lösung in steigender Konzentration (0-182mM im Assay) hinzugegeben.

| Natriumcitrat (mM) | 0   | 43  | 85  | 128 | 170 | 182 |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| MER (nmol/mlxh)    | 193 | 169 | 161 | 129 | 121 | 101 |

Ergebnisse: Bei steigender Natriumcitrat-Konzentration kam es im Sinne einer linearen Korrelation zu einem Abfall der LCAT-Meßwerte. Bei einer Natriumcitrat-Konzentration von 0,182M war nur 55% der ursprünglichen LCAT-Aktivität nachweisbar.

### 3.2.11. Einfluß von Natriumcitrat, Magnesiumchlorid und Natriumphosphorwolframat auf die Farbreaktion bei der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung

-----

Zur Untersuchung kamen vier Serumproben des selben Spenders:

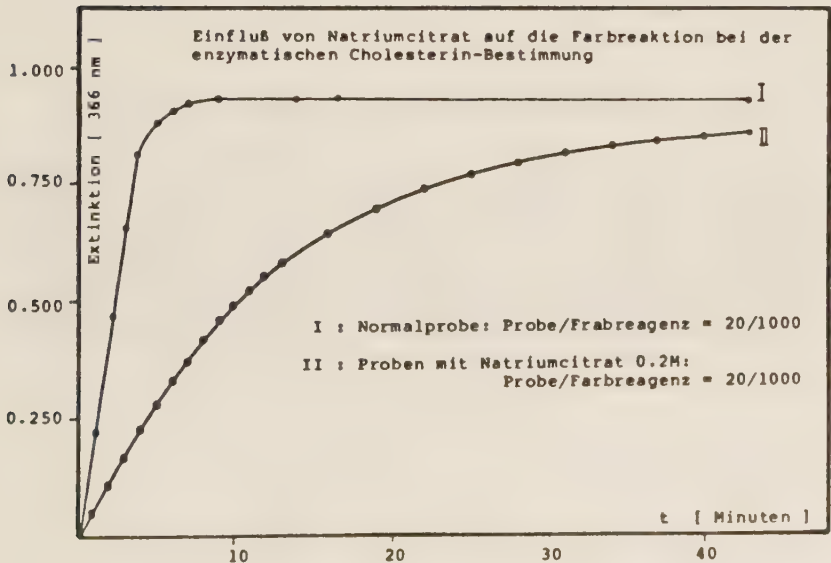
1. natives Serum;
2. Serum, das Natriumcitrat 0.2M enthielt;
3. Serum, das Magnesiumchlorid 0.18M enthielt;
4. Serum, das Natriumphosphorwolframat 2% enthielt;

20µl der Serumproben wurden zu 1000µl Farbreaenz pipettiert. Die Extinktionsänderung über die Zeit wurde mit einem an ein Eppendorf-Photometer gekoppelten Schreiber untersucht.

Ergebnisse: Bei der Untersuchung der Proben-Nr. 1., 3., und 4. kam es etwa 10 Minuten nach Reaktionsstart zu einem definitiven Abschluß der Extinktionszunahme; die Farbreaktion war damit beendet.

Bei der Analyse der Natriumcitrat-enthaltenden Serumprobe war die Steilheit der Kurve, die die Extinktionszunahme über die Zeit beschreibt, deutlich geringer. Die Extinktionswerte waren auch nach 40 Minuten Inkubationszeit noch nicht stabil. Es kann also gefolgert werden, daß Natriumcitrat zu einer Hemmung der Farbreaktion führt.

Magnesiumchlorid und NaPW hatten in Konzentrationen von 0.2M bzw. 2% keinen inhibierenden Einfluß auf die Farbreaktion.



### 3.2.12. LCAT-Aktivität in der $d > 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion

---

#### 3.2.12.1. Charakterisierung der $d > 1,210\text{g/ml}$ - Fraktion

---

Die Untersuchung der  $d > 1,210\text{g/ml}$ -Serumfraktion erfolgte alternativ zu der LCAT-Aktivitätsmessung im Fällungsüberstand nach Delipoproteinisierung. Cholesterin wurde enzymatisch in der  $d > 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion nicht nachgewiesen. Die Lipidelektrophorese erbrachte keinen Nachweis von HDL. Aufgrund mangelnden Substrates war eine LCAT-Aktivität nicht meßbar. Zugabe von Dili-neoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen führte zu prozentualen Veresterungsraten, die durchschnittlich höher lagen als in der  $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion. Die nephelometrisch nachweisbaren Apolipoprotein A-I Konzentrationen zwischen 40 und 54 mg/dl reichten für die LCAT-Aktivierung aus. Die LCAT-Aktivität in der  $d > 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion war derart niedrig, (Verdünnung durch Ultrazentrifugation, Dialyse und Liposomen), daß eine enzymatische Messung der Veresterungsrate nur bei Inkubationszeiten von drei und mehr Stunden möglich war.

#### 3.2.12.2. Charakterisierung der $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion

---

Auch in der  $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion wurde LCAT-Aktivität nachgewiesen. Dabei lag die fraktionelle LCAT-Rate in dieser Fraktion durchschnittlich niedriger als in der  $d > 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion. Zugabe von  $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion zu der  $d > 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion führte zu einer Steigerung der fraktionellen LCAT-Rate. Bei Vereinigung der  $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion mit der  $d < 1,210\text{g/ml}$ -Fraktion wurden durchschnittlich 30% der ursprünglichen LCAT-Aktivität der Serumprobe wiedergefunden.

### 3.2.12.3. Apolipoprotein A-I Konzentration in den Fraktionen d>1,210g/ml und d<1.210g/ml

Die Messung der Apolipoprotein A-I Konzentration wurde nephelometrisch in sechs verschiedenen Serumproben sowohl in der d>1,210g/ml-Fraktion als auch in der d<1.210g/ml-Fraktion durchgeführt.

| Proben-Nr. | Apolipoprotein A-I Konzentration (mg/dl) |                      |                            |
|------------|------------------------------------------|----------------------|----------------------------|
|            | d>1.210g/ml-Fraktion                     | d<1,210g/ml-Fraktion | d>1.210g/ml<br>d<1.210g/ml |
| 1          | 40                                       | 136                  | 1 : 3.4                    |
| 2          | 40                                       | 136                  | 1 : 3.4                    |
| 3          | 54                                       | 140                  | 1 : 2.6                    |
| 4          | 50                                       | 138                  | 1 : 2.8                    |
| 5          | 48                                       | 146                  | 1 : 3.0                    |
| 6          | 47                                       | 140                  | 1 : 3.0                    |

Ergebnisse: Die Apolipoprotein A-I Konzentration lag bei durchschnittlich 46.5 +/- 5,6 mg/dl. Diese Konzentration war für die Aufrechterhaltung der LCAT-Aktivität vollständig ausreichend. Die durchschnittliche Apolipoprotein A-I Konzentration der d>1.210g/ml-Fraktion entsprach der Apolipoprotein A-I Konzentration nach Delipoproteinsierung mittels Lipoproteinpräzipitation.

### 3.2.12.4. LCAT-Aktivität bei Apo-HDL Zugabe zu der d>1.210g/ml-Fraktion

Die Untersuchung galt der Frage, inwieweit eine Apo-HDL-Zugabe zu der d>1.210g/ml-Fraktion die LCAT-Aktivität beeinflusst.

Reaktionsbedingungen: Zu 200µl der 1.210g/ml-Fraktion und 100µl Cholesterin/Dilinoeoyl-Lecithin-Liposomen (PC/UC=3.8) wurden 50µl Apo-HDL in steigender Konzentration (0-110µg/Assay) hinzugegeben. Die LCAT-Aktivität wurde enzymatisch nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bestimmt.

| - 60 -                                               |                                                 |                   |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|
| Apo-HDL im Assay<br>( $\mu\text{g}/350\mu\text{l}$ ) | MER<br>( $\text{nmol}/\text{ml}\cdot\text{h}$ ) | FER<br>( $\%$ /h) |
| 0                                                    | 76                                              | 16.0              |
| 10                                                   | 65                                              | 14.0              |
| 30                                                   | 72                                              | 16.0              |
| 50                                                   | 73                                              | 16.3              |
| 70                                                   | 78                                              | 18.2              |
| 90                                                   | 79                                              | 18.0              |
| 100                                                  | 85                                              | 18.2              |

Ergebnisse: Die Apo-HDL-Zugabe zu der  $d>1.210\text{g}/\text{ml}$ -Fraktion hatte keine signifikante aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die LCAT-Aktivität.

### 3.2.12.5. Optimales PC/UC-Verhältnis für die LCAT-Reaktion in der $d>1.210\text{g}/\text{ml}$ -Fraktion

Das Ziel der Untersuchung war die Definition eines optimalen PC/UC-Verhältnisses des Liposomen-Substrates für die LCAT-Aktivität in der  $d>1.210\text{g}/\text{ml}$ -Fraktion.

Reaktionsbedingungen: Zu  $100\mu\text{l}$  der Probe ( $d>1.210\text{g}/\text{ml}$ -Fraktion des selben Spenders) wurden  $100\mu\text{l}$  Cholesterin/Dilinoeoyl-Lecithin-Liposomen mit einem PC/UC-Quotienten von 2.6-7.5 gegeben. Die Cholesterin-Konzentration der Liposomen-Präparationen wurde annähernd konstant gehalten ( $41\text{-}46\text{mg}/\text{dl}$ ).

| Cholesterin-Konz.<br>( $\text{mg}/\text{dl}$ ) | PC/UC | MER<br>( $\text{nmol}/\text{ml}\cdot\text{h}$ ) | FER<br>( $\%$ /h) |
|------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------|-------------------|
| 44                                             | 7.5   | 58                                              | 2.5               |
| 41                                             | 7.1   | 58                                              | 2.7               |
| 45                                             | 6.2   | 63                                              | 2.7               |
| 46                                             | 4.1   | 121                                             | 5.1               |
| 46                                             | 3.8   | 156                                             | 6.5               |
| 41                                             | 2.6   | 46                                              | 2.2               |

Ergebnisse: Maximale LCAT-Aktivität wurde in der  $d>1.210\text{g}/\text{ml}$ -Fraktion bei einem PC/UC-Quotienten von 3,8 gemessen.

### 3.3. LCAT-Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays

---

#### 3.3.1. Präzision des Radioisotopen-Assays

---

An einem Tag wurden 10 Messungen einer Serumprobe des selben Spenders durchgeführt. Bei einer mittleren fraktionellen LCAT-Rate von 0.76% und einer Standardabweichung von  $\pm 0.055\%$  wurde ein Variationskoeffizient von 7,2% errechnet.

#### 3.3.2. Vergleich der Digitonin-Fällungsmethode mit der chromatographischen Trennung der Lipidfraktionen

---

Die Trennung von Cholesterinestern und unverestertem Cholesterin über die Digitonin-Fällungsmethode kann erheblich schneller durchgeführt werden und zeigte zudem eine gute Reproduzierbarkeit (bei einem Variationskoeffizienten von 3,2% für die [3H]-Cholesterin-Messung im Überstand). Der entscheidende Nachteil dieser Methode liegt jedoch in dem Anteil des nicht ausgefällten, markierten, unveresterten Cholesterins im Überstand. Bis zu 0.5% des [3H]-Cholesterins blieben nach der Fällung im Überstand. Setzt man im LCAT-Assay [3H]-Cholesterin ein, das einer Aktivität von 100.000 cpm entspricht, so findet man im Überstand nach der Fällung Zählraten bis zu 500cpm. Bei sehr niedriger LCAT-Aktivität kann man die durch die Cholesterinester bedingte Zählrate nicht mehr ausreichend sicher von der Hintergrundsaktivität des markierten, unveresterten Cholesterins trennen.

Aus diesem Grunde wurde die Digitonin-Fällungsmethode bei der LCAT-Aktivitätsbestimmung zugunsten der chromatographischen Trennung der Lipide verlassen.

Die Dünnschicht-Chromatographie ist nicht zuletzt auf Grund der dazu nötigen Lipidextraktion das deutlich zeitaufwendigere Verfahren. Die Chromatographie an sich erwies sich jedoch als außerordentlich scharf trennendes und zuverlässiges Verfahren.

### 3.4. Untersuchung des Effektes von Apolipoprotein A-I sowie der Apolipoprotein A-I Subfraktionen auf die LCAT- Aktivität

#### 3.4.1. Apolipoprotein A-I Konzentrationen bei der LCAT- Enzym-Reinigung

Die Messung der Apolipoprotein A-I Konzentrationen im Verlauf der LCAT-Enzym-Reinigung erfolgte mittels der Laser-Nephelometrie.

1. Apolipoprotein A-I Konzentration im gepoolten Serum:  
145mg/dl;
2. Nach der ersten DEAE-Sephadex A-50 Chromatographie:  
140mg/dl;
3. Nach der zweiten DEAE-Sephadex A-50 Chromatographie:  
57,4mg/dl;
4. Nach der Hydroxylapatit-Chromatographie: nicht mehr  
nachweisbar;

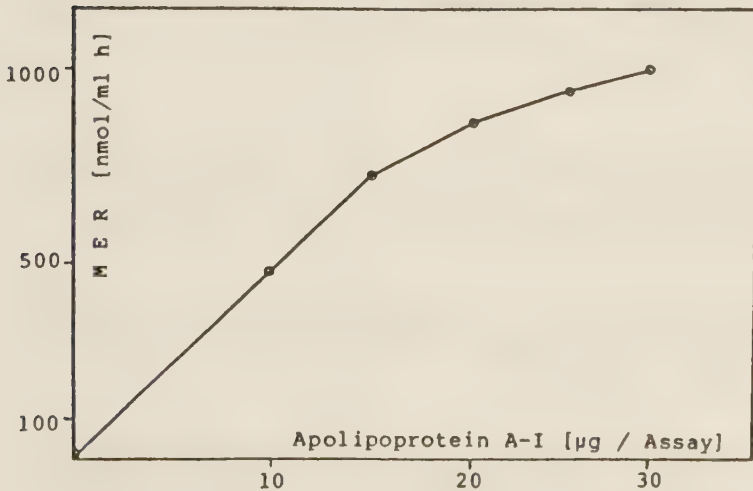
#### 3.4.2. LCAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Apolipo- protein A-I Konzentration

Die Untersuchung wurde durchgeführt, um den linearen Bereich der Aktivierung der gereinigten LCAT-Enzym-Präparation durch Apolipoprotein A-I zu definieren.

Reaktionsbedingungen: 5µl der LCAT-Enzym-Präparation, 20µl Apolipoprotein A-I (0-35µg) wurden bei einem finalen Reaktionsvolumen von 265µl zusammengegeben und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

| Apolipoprotein A-I<br>im Assay ( $\mu\text{g}/265\mu\text{l}$ ) | FER<br>(%/h) | MER<br>(nmol/mlxh) |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| 0                                                               | -            | -                  |
| 10                                                              | 1.5          | 475                |
| 15                                                              | 2.3          | 729                |
| 20                                                              | 2.7          | 859                |
| 25                                                              | 3.0          | 950                |
| 30                                                              | 3.1          | 998                |
| 35                                                              | 3.1          | 980                |

Ergebnisse: Bis zu einer Apolipoprotein A-I Konzentration von  $15\mu\text{g}/265\mu\text{l}$  ( $5.66\text{mg}/\text{dl}$ ) war die LCAT-Reaktion linear.



### 3.4.3. Isolierung von Apolipoprotein A-I Subfraktionen ----- mittels Umkehrphasen-HPLC -----

Die Trennung von Apolipoprotein A-I Subfraktionen mittels der Umkehrphasen-HPLC erbrachte einen Hauptpeak sowie zwei deutlich kleinere Protein-Subfraktionen. Diese Ergebnisse blieben unbeeinflusst von der Vorbehandlung der Apolipoprotein A-I Proben bei saurem oder alkalischem pH sowie bei neutralem pH in Gegenwart von 6M Harnstoff. Sowohl die HPLC über ein Polyamid-Gel (PNP-I) als auch über ein Silika-Gel (Aquapore RP 300) erbrachte identische Chromatogramme. Der Verlust von Apolipoprotein A-I im Rahmen der HPLC blieb sehr gering. Dies konnte durch einen Vergleich der Peak-Fläche mit verschiedenen Apolipoprotein Konzentrationen gezeigt werden:  
 $1\mu\text{g}/0.21\text{cm}^2$ ,  $2,8\mu\text{g}/0.55\text{cm}^2$ ,  $8.4\mu\text{g}/1.67\text{cm}^2$  und  $50\mu\text{g}/10.72\text{cm}^2$ .

Der Protein-Hauptpeak wurde durch eine Aminosäuren-Analyse (203) sowie durch die analytische Isoelektrofokussierung pH-Bereich(4-6) in 8-molarem Harnstoff überprüft. Dabei ergab die Aminosäuren-Analyse das typische Aminosäure-Muster von Apolipoprotein A-I. In der analytischen Isoelektrofokussierung wurde das vollständige Isoformenspektrum wiedergefunden. Die mittels der Umkehrphasen-HPLC voneinander getrennten Apolipoprotein A-I Subfraktionen unterschieden sich also weder in ihrem Aminosäuremuster noch in ihren isoelektrischen Punkten.

### 3.4.4. Kofaktoreigenschaften der HPLC-isolierten Apolipo- ----- protein A-I Subfraktionen bei der LCAT-Reaktion -----

Die Fragestellung der Untersuchung war, in wie weit sich die mittels der Umkehrphasen-HPLC getrennten Apolipoprotein A-I Subfraktionen bezüglich ihrer LCAT-aktivierenden Eigenschaft unterschieden.

Reaktionsbedingungen: Untersucht wurden die HPLC-getrennten Fraktionen Peak I, Peak II und Peak III. Bei einem Ansatz-Volumen von 265 $\mu\text{l}$  wurden 15 $\mu\text{g}$  der entsprechenden Fraktionen pro Ansatz zugesetzt. Alle Bestimmungen wurden als Dreifach-Assays durchgeführt.

|                      | MER<br>(pmol/ml xh) | FER<br>(%/h) |
|----------------------|---------------------|--------------|
| Apolipoprotein A-I : | 747                 | 2.3          |
| Fraktion I :         | 669                 | 2.1          |
| Fraktion II :        | 651                 | 2.0          |
| Fraktion III :       | 729                 | 2.3          |

# Ergebnisse:

Die LCAT-Aktivierung durch die Apolipoprotein A-I Subfraktionen war annähernd gleich und zeigte im Vergleich zu der LCAT-Aktivierung durch unfraktioniertes Apolipoprotein A-I keinen signifikanten Unterschied.

### 3.5. Ernährungsstudien

=====

#### 3.5.1. Ergebnisse der Diätgruppe IFK

-----

Tabelle: 1, 6;                      Abbildung: 3;  
(Originalliteratur: 128, 163)

Die Gruppe IFK erhielt nach drei Monaten einer fettmodifizierten Diät eine weitere drei Monate andauernde Kontrolldiät.

Unter der fettmodifizierten Diät war das Serumgesamtcholesterin bzw. das LDL-Cholesterin um 11,5% ( $p < 0,01$ ) bzw. um 9,8% ( $p < 0,01$ ) niedriger als in der Kontrolldiät.

Entsprechend fiel der Quotient aus LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin bei unverändertem HDL-Cholesterin um 11,1% ( $p < 0,01$ ) niedriger aus.

Bei gleichzeitig niedrigeren Werten des veresterten Cholesterins (-11,0%,  $p < 0,01$ ) und des unveresterten Cholesterins (-10,9,  $p < 0,01$ ) blieb der CE/UC-Quotient konstant. Die molare Veresterungsrate (MER) der LCAT zeigte keine Veränderungen. Die Mittelwerte der fraktionellen LCAT-Rate (FER) lagen um 9,8% (nicht signifikant) höher als in der Kontrolldiät. Der Linolsäuregehalt der Cholesterinester war unter der fettmodifizierten Diät um 13,9% ( $p < 0,005$ ) höher. Die Serumtriglyzeride lagen um 19,8% ( $p < 0,01$ ) unter den Werten der Kontrolldiät.

Konstant blieben die Konzentrationen der Apolipoproteine A-I, A-II, B und E. Auch der Apolipoprotein A-I Gehalt der der HDL-Subfraktionen HDL2 und HDL3 änderte sich nicht.

#### 3.5.2. Ergebnisse der Diätgruppe IKF

-----

Tabelle: 2,3,6;                      Abbildung 3;  
(Originalliteratur 128, 163)

Die Gruppe IKF erhielt nach drei Monaten einer Kontrolldiät eine weitere drei Monate andauernde fettmodifizierte Diät.

Unter der fettmodifizierten Diät kam es in dieser Gruppe zu einem Abfall des Serumgesamtcholesterins um 15,7% ( $p < 0,005$ ) und des LDL-Cholesterins um 19,2% ( $p < 0,005$ ). Bei unverändertem HDL-Cholesterin sank der Quotient aus LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin um 20% ( $p < 0,005$ ). Die Meßwerte für verestertes und unverestertes Cholesterin lagen unter der fettmodifizierten Diät um 13,4% ( $p < 0,005$ ) bzw. 25,7% ( $p < 0,05$ ) niedriger, was zu einem Anstieg des CE/UC-Quotienten um 20% führte.

Die molare Veresterungsrate der LCAT blieb unverändert, die fraktionelle LCAT-Rate stieg unter der fettmodifizierten Diät um 25,2% an ( $p < 0.05$ ).

Der Linolsäuregehalt der Cholesterinester wurde um 17% ( $p < 0.005$ ) angehoben.

Bei einem Abfall des VLDL-Cholesterins um 32% ( $p < 0,01$ ) änderte sich der VLDL-Triglyzeridgehalt wie auch die Serumtriglyzerid-Konzentration nicht. Ebenfalls an den VLDL wurde ein um 25,5% ( $p < 0,01$ ) niedrigerer Apolipoprotein A-I Gehalt gefunden. Die Konzentrationen von Apolipoprotein A-I, A-II, B und C änderten sich nicht. Auch die Apolipoprotein A-I Konzentration in den HDL-Subfraktionen HDL2 und HDL3 blieb konstant. Lediglich die Apolipoprotein E Konzentration sank um 18% ( $p < 0.05$ ), was einen entsprechend niedrigeren Quotienten aus Apolipoprotein E/ Apolipoprotein C (27%,  $p < 0.01$ ) zur Folge hatte. Zudem stieg der Quotient aus Apolipoprotein E3/E2 unter der fettmodifizierten Diät um 26% an ( $p < 0,01$ ).

### 3.5.3. Ergebnisse der Diätgruppe II

-----  
Tabelle: 4,5,6;                      Abbildung: 4,5;  
(Originalliteratur: 77, 165)

Die weiblichen Probanden der Diätgruppe II erhielten nach drei Monaten einer fettmodifizierten Diät eine weitere drei Monate andauernde Kontrolldiät.

Nach der fettmodifizierten Diät wurden Serumgesamtcholesterin -und LDL-Cholesterin-Werte gemessen, die um 5,1% ( $p < 0,05$ ) bzw. 9,3% ( $p < 0.05$ ) niedriger lagen als nach der Kontrolldiät. Das unveresterte Cholesterin fiel um 34,3% ( $p < 0,01$ ), während das veresterte Cholesterin gleich blieb. Der CE/UC-Quotient stieg unter der fettmodifizierten Diät um 61,2% ( $p < 0.01$ ) an. Der Anteil der Linolsäureester an den Cholesterinestern erhöhte sich um 17,2% ( $p < 0,005$ ). Die fraktionelle LCAT-Rate steigerte sich um 46,6% ( $p < 0,025$ ), wohingegen die molare Veresterungsrate gleich blieb.

Die Apolipoprotein A-I -und B -Konzentrationen sanken um 16,8% ( $p < 0,01$ ) bzw. 18,0% ( $p < 0,01$ ) bei unveränderten Apolipoprotein A-II Konzentrationen. Konstant blieben HDL- und VLDL-Cholesterin, der Quotient aus LDL-Cholesterin/ HDL-Cholesterin, die Triglyzeride in VLDL, LDL und HDL und entsprechend auch die Serumgesamttiglyzeride.

3.5.4. Vergleich der Resultate nach dreimonatiger Kon-  
trollldiät in den drei Probandengruppen

Tabelle: 7;      Abbildung: 6

Verglichen wurden nur die Parameter nach der Kontrollldiät. Annähernd gleich waren in allen drei Probandengruppen (II, IKF und IKF) die Gesamtcholesterin-Konzentrationen, das LDL-Cholesterin, Serumapolipoprotein A-I, A-II und B. Die Serum-Triglyzeride lagen bei den weiblichen Probanden (Gruppe II) mit  $81 \pm 32$  mg/dl niedriger als bei den Männern mit  $107 \pm 50$  mg/dl (Gruppe IKF) und  $121 \pm 78$  mg/dl (Gruppe IKF). Entsprechend waren auch die VLDL-Triglyzerid-Spiegel bei den Frauen niedriger als bei den Männern ( $40 \pm 26$  mg/dl in Gruppe II,  $81 \pm 51$  mg/dl in Gruppe IKF). Desgleichen lagen die VLDL-Cholesterin-Konzentrationen mit  $9 \pm 8$  mg/dl bei den Frauen niedriger als bei den Männern mit  $25 \pm 10$  mg/dl (Gruppe IKF). Das unveresterte Cholesterin lag mit  $35 \pm 12$  mg/dl in der Gruppe II niedriger als in der Gruppe IKF mit  $45 \pm 11$  mg/dl oder der Gruppe IKF mit  $46 \pm 17$  mg/dl. Die HDL-Cholesterin-Werte waren bei den Frauen mit  $68 \pm 14$  mg/dl deutlich höher als bei den Männern mit  $43 \pm 13$  mg/dl (IKF) bzw.  $43 \pm 8$  mg/dl (IKF). Der CE/UC-Quotient fiel bei den Frauen mit  $4,9 \pm 1,0$  höher aus als bei den männlichen Probanden mit  $4,0 \pm 0,8$  (IKF) bzw.  $3,9 \pm 1,2$  (IKF). Die molare LCAT-Rate bei den weiblichen Probanden und bei der Gruppe IKF war mit  $129 \pm 22$  nmol/mlxh (II) und  $113 \pm 41$  nmol/mlxh (IKF) relativ ähnlich. Im Gegensatz dazu wurde in der Gruppe IKF eine deutlich höhere Veresterungsrate gefunden ( $166 \pm 22$  nmol/mlxh). Auch die fraktionelle Veresterungsrate in den Gruppen II ( $13,3 \pm 2,8\%$ /h) und IKF ( $11,1 \pm 5,4\%$ /h) niedriger als in der Gruppe IKF ( $16,3 \pm 7,8\%$ /h).

### 3.6. Ergebnisse der Sitosterin-Studie

---

Tabelle: 9;  
(Originalliteratur: 162, 164)

Eine zwei Monate lange Therapie mit  $\beta$ -Sitosterin hatte eine Zunahme der fraktionellen Veresterungsrate von 48,6% sowie der molaren Veresterungsrate um 22% zur Folge. Die Steigerung der LCAT-Rate war begleitet von einer Senkung des Serumgesamtcholesterins (-12,6%), des veresterten Cholesterins (-12%), des unveresterten Cholesterins (-14,9%) sowie des LDL-Cholesterins (-10,9%). Der Quotient aus LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin fiel um 10,6%, der Quotient aus LDL-Cholesterin/Apolipoprotein B fiel um 17% ab. Der CE/UC-Quotient, das HDL-Cholesterin, die Serum-Konzentration von Triglyzeriden Apolipoprotein B -und A-I blieben unverändert. Drei Monate nach Beginn der  $\beta$ -Sitosterin-Therapie betrug die Zunahme der MER 60,5% und der FER 05,7%. Das Serumgesamt-Cholesterin lag um 17,7% niedriger, das veresterte Cholesterin war um 17%, das unveresterte Cholesterin um 20,2% abgesunken. Das HDL-Cholesterin allerdings zeigte nach drei Monaten der  $\beta$ -Sitosterin-Therapie einen signifikanten Cholesterin-Abfall um 13,1%.

### 3.7. Vergleich der LCAT-Aktivität bei männlichen und weiblichen normolipidämischen Patienten

Tabelle: 10;

20 männliche und 9 weibliche normolipidämische, gesunde Probanden wurden miteinander verglichen. Kein Unterschied wurde gefunden bei den Parametern Serumgesamtcholesterin, verestertem Cholesterin, LDL-Cholesterin, fraktioneller LCAT-Rate, Apolipoprotein A-II -und B sowie dem Linolsäuregehalt der Cholesterinester, dem Quotienten aus LDL-Cholesterin/Apolipoprotein B und der fraktionellen LCAT-Rate. Die Serumtriglyzeride lagen bei den weiblichen Probanden um 29% niedriger; das HDL-Cholesterin lag um 58% höher; die Apolipoprotein A-I Konzentrationen erreichten bei den Frauen um 24% höhere Werte.

Bei um 24% niedrigerem unverestertem Serumcholesterin wurde die molare Veresterungsrate der Frauen gegenüber den männlichen Probanden um 7,9% niedriger gefunden

### 3.8. LCAT-Aktivität bei Hyperlipoproteinämie Typ IIa

-Patienten

Tabelle: 11;

Verglichen wurden 8 Hyperlipoproteinämie Typ IIa Patienten mit 29 gesunden normolipidämischen Probanden. Entsprechend der Klassifizierung als Typ IIa einer Hyperlipoproteinämie lag das Serumcholesterin um 76% über den Werten der Kontrollgruppe, das LDL-Cholesterin lag um 92% höher, Cholesterinester um 74%, unverestertes Cholesterin um 76%, HDL-Cholesterin um 20%, Apolipoprotein B um 41%, der LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin-Quotient um 57%, der LDL-Cholesterin/Apolipoprotein B Quotient um 40%.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die molare LCAT-Aktivität um 44% niedriger, die fraktionelle LCAT Rate lag um 74% niedriger.

Keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe zeigten die Serum-Triglyzerid-Konzentrationen, der CE/UC-Quotient und die Apolipoprotein A-I Konzentrationen.

#### 4. Diskussion

=====

##### 4.1. Der enzymatische LCAT-Assay als Eigensubstrat-

-----

##### Methode

-----

##### 4.1.1. Methodenvergleich

-----

Die enzymatische Bestimmung der LCAT-Aktivität zeichnet sich durch eine deutlich bessere Praktikabilität und Reproduzierbarkeit aus. Die klassischen Methoden, wie sie von den Autoren Stokke und Norum (135) sowie Glomset und Wright (62) beschrieben wurden, eignen sich für den routinemäßigen klinischen Einsatz wenig. Der hohe technische und zeitliche Aufwand dieser LCAT-Assays kann nur von hochspezialisierten Laboratorien geleistet werden. Während der enzymatische LCAT-Assay innerhalb von 2 Stunden durchgeführt werden konnte, bedurfte der Radioisotopen-Assay einer Arbeitszeit von etwa 8 Stunden.

Der im Rahmen der LCAT-Reaktion meßbare Umsatz an unverestertem Cholesterin (UC) liegt zwischen 20 und 200nmol/h. Chemisch-colorimetrische und gaschromatographische Methoden müssen aufgrund ihrer geringen Sensitivität hohe Variationskoeffizienten in Kauf nehmen, die nur durch eine Steigerung der Parallelansätze auszugleichen sind (24, 91, 113, 117).

Der hier vorgestellte enzymatische LCAT-Assay genügt den Kriterien einer guten Reproduzierbarkeit sowie einer einfachen und schnellen Durchführbarkeit. Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Methode liegt darin, daß dieser Assay als Eigensubstrat-Ansatz gehandhabt werden kann. Die Probleme der Äquilibration der Radioisotopen mit den Substrat-Lipiden der LCAT können so vermieden werden (62,135). Die direkte enzymatische Messung des unveresterten Cholesterins führt zu einer unmittelbaren Bestimmung der molaren Umsatzrate. Die molare LCAT-Aktivität wird also nicht wie bei den Radioisotopen-Methoden erst über den Umweg der colorimetrischen Messung des Gesamtcholesterins aus der fraktionellen LCAT-Aktivität errechnet. Das Ziel des enzymatischen LCAT-Assays muß also darin bestehen, über die Messung möglichst hoher Umsatzraten die Präzision der Meßmethode zu erhöhen.

Die Inkubationsdauer spielt insofern eine wesentliche Rolle, als die LCAT-Reaktion "in vitro" nur über die ersten 30-40 Minuten der Reaktionszeit linear ist. Entscheidend für die in diesem Zeitraum gemessene Veresterungsaktivität ist die Enzym-Konzentration (9, 151) sowie die Enzym-Substrat-Interaktion. Entsprechend dem von Norum (109) vorgelegten Dreiphasen-Modell wird die initiale lineare Phase A durch die in der Phase B einsetzenden Produktinhibition beendet. Dabei wird die Produktinhibition verstanden als unzureichende Fähigkeit des Chylomikronen-

VLDL -und LDL- Pools, Cholesterinester aus dem postulierten LCAT-HDL-Komplex aufzunehmen (52). Erst in der Phase C kommt als zusätzlicher Faktor das Phänomen des Substratmangels zum Tragen. Unter der Voraussetzung, daß alles verfügbare LCAT-Enzym auch Veresterungsaktivität aufweist (9), kommt also die Messung der initialen linearen Phase der LCAT-Reaktion der Enzym-Konzentration an sich und damit der LCAT-Aktivität "in vivo" am nächsten. Eine auf 30-40 Minuten begrenzte Reaktionszeit aber führt zu Cholesterin-Umsatzraten, die mittels einer enzymatischen Meßmethode insbesondere bei niedriger LCAT-Aktivität nur unter Inkaufnahme hoher Variationskoeffizienten meßbar sind (113). Der Versuch von Akanuma und Nagasaki (100), die Linearität der LCAT-Reaktion "in vitro" zu verlängern, gelang durch die Zugabe von Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen zum LCAT-Assay. Da Dipalmitoyl-Lecithin auf Grund der Substratspezifität der LCAT für ungesättigte Fettsäurereste nur ein unzureichendes Substrat der LCAT darstellt (13,51, 136), kann dieser LCAT-Assay als Eigensubstrat-Assay betrachtet werden. Der LCAT-Assay nach Akanuma et al. (100) wurde deshalb als Grundlage der im folgenden diskutierten enzymatischen Meßmethode übernommen. Gegenstand der Untersuchung war insbesondere die Verbesserung der Cholesterin-Bestimmung sowie die Untersuchung der Dipalmitoyl-Lecithin-bedingten LCAT-Aktivitätssteigerung.

#### 4.1.2. Die enzymatische Cholesterin-Bestimmung im LCAT-Assay

-----

Der enzymatische LCAT-Assay ist abhängig von der Sensitivität der Cholesterin-Bestimmungsmethode. Vergleicht man den von Akanuma et al. (100) beschriebenen Cholesterin-Bestimmungsansatz mit dem modifizierten Testsystem der Firma Merck, so kann man die Sensitivität beider Cholesterin-Bestimmungsmethoden als gleichwertig betrachten. Die Boehringer-Testkombination weist demgegenüber eine deutlich geringere Sensitivität auf. Bei Konzentrationen des unveresterten Cholesterins (UC), die unter 50mg/dl liegen, kann durch ein geeignetes Probe/Reagenz-Verhältnis (50 $\mu$ l/1000 $\mu$ l) mittels des Merck Kits eine doppelt so hohe Sensitivität als in dem Original-Akanuma-Testansatz. Dem Merck-Kit wurde sowohl auf Grund der einfacheren Handhabung als auch wegen der größeren Stabilität der Reagenzien und der besseren Reproduzierbarkeit der Vorzug gegeben. Der Merck-Kit lag als fertiger Testansatz mit monatelanger Haltbarkeit vor, während der von Akanuma vorgeschlagene Farbanalyse alle 24 Stunden neu zubereitet werden mußte.

Das Farbreagenz des Merck-Kits zeigte unter Lichteinwirkung eine signifikante Extinktionszunahme und wurde deshalb in abgedunkelten Gefäßen aufbewahrt.

2-Mercaptoäthanol inhibiert die Cholesterin-Oxidase des Cholesterin-Testansatzes. Üblicherweise wird 2-Mercaptoäthanol zur Stabilisierung der LCAT gegen eine mögliche Oxidation der Sulhydryl-Gruppen des Enzyms eingesetzt. Die Inhibition der Cholesterin-Oxidase-Reaktion durch 2-Mercaptoäthanol macht eine enzymatische Cholesterinbestimmung unmöglich. Für die vollständige Inhibition der Farbreaktion reichte eine 2-Mercaptoäthanol-Konzentration von 3mM in der Probe aus (Probe/Reagenz-Verhältnis = 50/1000). Mit 2-Mercaptoäthanol stabilisierte LCAT-Enzym-Präparationen können deshalb mittels des Merck-Testansatzes nicht untersucht werden. Die Untersuchung der LCAT-Enzym-Präparationen erfordert also den Einsatz des Radioisotopen-Assays. Bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50/1000 war die Farbreaktion bis zu einer Cholesterin-Konzentration von 50mg/dl linear.

Die Präzision des Cholesterin-Bestimmungsansatzes der Firma Merck war mit einem Variationskoeffizienten von 0,6% bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 50/1000 gut. Der Variationskoeffizient der enzymatischen LCAT-Bestimmung lag im Rahmen der within-day-Bestimmung bei 3,3% ( $n=15$ ;  $MER = 114 \pm 3,8$  nmol/mlxh).

Die an 16 verschiedenen Tagen durchgeführte LCAT-Aktivitätsbestimmung wies bei einem Variationskoeffizienten von 4,3% ebenfalls auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode hin ( $n=16$ ,  $MER = 99,3 \pm 4,3$  nmol/mlxh).

Akanuma et al. (100) gaben bei der Beschreibung des enzymatischen LCAT-Assays einen Variationskoeffizienten von 6% an. Bei der LCAT-Aktivitätsbestimmung im Serum übertrifft die enzymatische Methode eindeutig den Radioisotopen-Assay, der bei eigenen Untersuchungen einen Variationskoeffizienten von 7,2% aufwies. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit des Assays wurden alle Proben als Dreifachansätze gemessen. Proben, die eine UC-Konzentration von mehr als 50mg/dl aufwiesen, wurden bei einem Probe/Reagenz-Verhältnis von 20/1000 untersucht.

Eine Inaktivierung der LCAT nach Abschluß der Inkubation war nicht erforderlich. Die in dem Merck-Farbreagenz enthaltenen Detergenzien und Stabilisatoren führen zu einer raschen und vollständigen Inhibition der LCAT-Reaktion. Schon bei einem Probe/Farbreagenz-Verhältnis von 3,5 : 1,0 kam es zu einem vollständigen Stillstand der LCAT-Aktivität. Das übliche Probe/Farbreagenz-Verhältnis bei der Cholesterin-Bestimmung lag bei 0,05 : 1,0.

#### 4.1.3. Definition der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen

---

Akanuma et al. (100) setzten zur Verlängerung der initialen linearen Phase der LCAT-Reaktion Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen ein. Diese mit Hilfe eines Ultraschall-Desintegrators hergestellten Liposomen sind metastabil (38) und neigen sowohl bei 4°C als auch bei Zimmertemperatur zu Aggregation und Präzipitation. Die makroskopisch auftretende Trübung kann photometrisch bei 546nm objektiviert werden. Trotz dieser Instabilität wurde die LCAT innerhalb der ersten 50 Minuten nach Abschluß der Ultraschallbehandlung gleichbleibend aktiviert. Die LCAT-Aktivierung durch an verschiedenen Tagen angefertigte Liposomen-Präparationen war bei einem Variationskoeffizienten von 3,9% gut reproduzierbar. Oxidationsvorgängen oder anderen während der Ultraschallbehandlung auftretenden Denaturierungen des eingesetzten Dipalmitoyl-Lecithins ist bezüglich der LCAT-Aktivierung keine wesentliche Bedeutung beizumessen. Das bedeutet, daß einmal angefertigte Liposomen-Präparationen ohne Aktivitätsverlust an verschiedenen Tagen nach entsprechender wiederholter Ultraschallbehandlung zum Einsatz kommen können. Bei dem im LCAT-Assay üblichen Liposomen/Serum-Verhältnis von 1:2 haben die Liposomen keine signifikanten Extinktionsveränderungen bei der Cholesterinbestimmung zur Folge.

#### 4.1.4. Funktion der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen im LCAT-Assay

---

Dipalmitoyl-Lecithin selbst ist kein Substrat für die LCAT. Verglichen mit Dilinoyl-Lecithin als Substrat wird durch Dipalmitoyl-Lecithin nur etwa 2,6% (51) der LCAT-Aktivität erreicht. Dennoch aktiviert das Dipalmitoyl-Lecithin bei Zugabe zu Serum die LCAT-Reaktion. Die Zugabe von Dilinoyl-Liposomen bewirkt dagegen keine LCAT-Aktivierung, obwohl diese Liposomen ein optimales Substrat für die LCAT darstellen. Man muß also annehmen, daß im Serum bereits optimale Dilinoyl-Lecithin/Cholesterin-Verhältnisse bestehen. Die LCAT-Aktivierung durch Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen erreichte ein Maximum bei einer Lecithin-Konzentration von 200mg/dl im Lecithinsol (bei einem Serum/Lecithin-Verhältnis von 2:1). Aus Sicherheitsgründen wurde routinemäßig im LCAT-Assay eine Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentration von 250mg/dl verwendet. Die Dipalmitoyl-Lecithin stimulierte LCAT-Reaktion blieb über mindestens 120 Minuten linear. Die Linearität der initialen Reaktion wurde bei sieben verschiedenen Serumproben mit UC-Konzentrationen zwischen 30mg/dl und 100 mg/dl nach-

gewiesen. Aufgrund der größeren Praktikabilität wie auch aus Sicherheitsgründen wurde eine Inkubationszeit von 60 Minuten eingehalten.

Die lineare Phase der initialen LCAT-Reaktion bricht bei nicht-stimulierten Serumproben nach 40 Minuten ab und geht dann über in eine wiederum lineare Phase minderer LCAT-Aktivität. Nach 90-120 Minuten wird ein Plateau nicht mehr meßbarer Veresterungsaktivität erreicht. Dieser Befund entspricht dem Dreiphasen-Modell von Norum (109).

Dipalmitoyl-Lecithin verlängert die initiale lineare Phase der LCAT-Reaktion von 40 Minuten auf 120 Minuten. Gleichzeitig wird in dieser Phase eine Steigerung der LCAT-Reaktion beobachtet. Die LCAT-Stimulation kann in dieser Phase schon durch relativ geringe Dipalmitoyl-Lecithin-Konzentrationen erreicht werden (0.25-1.0mg/ml im Lecithin-Sol). Die Verlängerung der linearen Phase kann folgende Ursachen haben:

1. gesteigerte und verlängerte Substratverfügbarkeit;
2. Transfer von Cholesterinestern in die Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen und damit Minderung der Cholesterinesterbedingten Produkt-Inhibition der LCAT.

Die größere Bedeutung kommt wahrscheinlich dem optimierten Transfer von Cholesterinestern (CE) aus dem hypothetischen LCAT-HDL-Komplex in die Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen zu. Der CE-Transport wird mediatisiert über ein CE-Transfer-Protein, das 1978 von Chajek et al.(33) isoliert und charakterisiert wurde. LCAT-Aktivität und CE-Transfer-Aktivität stehen in enger funktioneller Beziehung. Beide Enzyme werden über Apolipoprotein A-I als Kofaktor aktiviert (34). Ein Transferprotein-mediatisierter Nettotransport von Cholesterinestern auf Nicht-Substrat-Liposomen konnte nachgewiesen werden (34). Die Einführung von Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen kann also als Vergrößerung der Speicherkapazität für Cholesterinester aufgefaßt werden. Die gesteigerte CE-Aufnahmekapazität hat eine Verlängerung der Transfer-Aktivität und entsprechend der LCAT-Aktivität zur Folge.

Die Steigerung der LCAT-Aktivität während der initialen Phase (0-40 Minuten) kann durch eine mit der LCAT-Aktivität gekoppelte Stimulation der CE-Transfer-Aktivität erklärt werden. Der LCAT-Aktivitäts-steigernde Effekt der Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen ist in der nicht-linearen Phase B (40-90 Minuten) der LCAT-Reaktion deutlich größer als in der Phase A (0-40 Minuten). Dieser Befund verleiht der Hypothese einer Aufhebung der Produkt-Inhibition größeres Gewicht.

Unter dem Gesichtspunkt der Aufhebung der Produkt-Inhibition trägt Dipalmitoyl-Lecithin zu einer Optimierung des Assays des LCAT-Enzym-Levels an sich bei. Der LCAT-Assay nach Akanuma ist insofern ein Eigensubstrat-Assay als die physiologischen Serumlipoproteine in unveränderter Form vorliegen und die Reaktions-stimulierenden Liposomen selbst kein eigentliches Substrat der LCAT darstellen.

#### 4.1.5. Vergleich der LCAT-Aktivität in Dipalmitoyl-Lecithin stimulierten und nicht-stimulierten Serumproben

Die LCAT-Aktivität in Dipalmitoyl-Lecithin-stimulierten und nicht stimulierten Serumproben wurde bei 27 Einzelproben normolipidämischer Probanden untersucht. Die fraktionelle LCAT-Aktivität der nicht stimulierten Proben lag durch durchschnittlich um 57% niedriger, die molare Veresterungsrate lag um 56% niedriger als bei den stimulierten Proben. Dipalmitoyl-Lecithin-Liposomen haben also nicht nur einen linearitätsverlängernden Effekt, sondern über die Angaben von Akanuma und Nagasaki (100) hinaus auch einen LCAT-Aktivitätssteigernden Effekt.

#### 4.1.6. Normwerte der LCAT-Aktivitätsmessung nach Akanuma

Bei 54 normolipidämischen Probanden, die alle medizinisch gesund waren, wurde die LCAT-Aktivität untersucht. Die molare LCAT-Aktivität lag durchschnittlich bei  $113 \pm 52$  nmol/mlxh, die fraktionelle LCAT-Rate bei  $9,2 \pm 4,1$  %/h, die Konzentration des unveresterten Cholesterins betrug im Durchschnitt  $46 \pm 14$  mg/dl. Signifikante Unterschiede in molarer und fraktioneller LCAT-Aktivität zwischen männlichen und weiblichen Probanden konnten nicht festgestellt werden. Die von Akanuma et al. (100) anhand von 63 Untersuchungen ermittelte durchschnittliche molare LCAT-Aktivität lag dagegen bei  $89 \pm 17$  nmol/mlxh. Eine Erklärung für die von Akanuma angegebenen niedrigeren LCAT-Aktivitätswerte liegt möglicherweise in der Tatsache begründet, daß Akanuma die LCAT-Aktivität nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bestimmte. Eigene Untersuchungen geben Anhalt dafür, daß die LCAT-Aktivität der Lecithin-stimulierten Serumproben nicht immer über 120 Minuten linear bleibt. Die sich auf diese Weise ergebenden niedrigeren Meßwerte könnten Einfluß gehabt haben auf die Berechnung der von Akanuma veröffentlichten Durchschnittswerte der molaren LCAT-Aktivität. In den vorliegenden Untersuchungen wurde dagegen die Inkubationszeit auf 60 Minuten begrenzt.

Vergleicht man die in dieser Untersuchung ermittelten Normwerte mit den aus der Literatur bekannten Durchschnittswerten, so liegen die LCAT-Aktivitätsmessungen des enzymatischen LCAT-Assays höher als die des Radioisotopen-Assays. Stokke et al. (140) fand bei Männern durchschnittliche Veresterungsraten von 92 nmol/mlxh. Wahrscheinlich kommt es

auf Grund der nicht vollständigen Äquilibration der exogenen Cholesterin-Isotopen mit dem endogenen LCAT-Substrat zu erniedrigten Meßwerten (9). Die bei 54 Normalprobanden ermittelte Streubreite der molaren bzw. der fraktionellen LCAT-Aktivität war mit einem Variationskoeffizienten von 46% bzw. 45% annähernd gleich groß. Diese hohe interindividuelle Streubreite findet ihre Erklärung in der ebenfalls erheblichen Schwankungsbreite der die LCAT-Aktivität modulierenden Lipid- und Lipoproteinparameter. So zeigt das unveresterte Cholesterin bei den 54 Probanden einen Variationskoeffizienten von 30%.

#### 4.1.7. Charakterisierung des LCAT-Enzyms im enzymatischen LCAT-Assay

Die LCAT-Aktivität im Serum ist relativ stabil. Serumproben können ohne Enzymverlust über sechs Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Bei minus 20°C eingefrorene Serumproben bewahren über fünf Monate ihre vollständige Enzymaktivität. Die LCAT entfaltet ihre maximale Aktivität in einem pH-Bereich zwischen pH 7 und pH 8. Ein Plateau der LCAT-Aktivität ergab sich bei pH 7,65 - 7,85. Glomset et al. (64) und Mehrnoosh (94) gaben dagegen das pH-Optimum der LCAT bei einem pH von 8,0 an. Die LCAT-Reaktion ist temperaturabhängig. Maximale LCAT-Aktivitäten wurden bei 40°C gemessen. Bei 37°C wurden 91% der maximalen Aktivität erreicht, bei 24°C 1,3%, bei 4°C war keine Enzymaktivität mehr nachweisbar. Der relativ steile Kurvenverlauf der LCAT-Aktivität zwischen 30°C und 40°C macht, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, eine sehr genaue Einstellung und Überwachung der Inkubationstemperatur notwendig. Die irreversible Inaktivierung der LCAT wurde durch Erhitzen der Serumprobe auf 56°C erreicht, nachdem schon bei 50°C keine LCAT-Aktivität mehr nachweisbar war. Die Zugabe von hitzeinaktiviertem Serum zu einer unbehandelten Serumprobe des gleichen Spenders führte nicht zu einer linearen Beziehung zwischen Verdünnungsfaktor und LCAT-Aktivität. Dieser Umstand erklärt sich durch die deutlich schlechteren Substrateigenschaften des hitzeinaktivierten Serums (24). Offenbar kommt es temperaturbedingt zu einer partiellen Denaturierung des Lipoprotein-Substrates der LCAT. In diesem Umstand liegen auch die ohnehin deutlich niedrigeren Meßergebnisse des klassischen LCAT-Assays nach Glomst und Wright (62) begründet.

## 4.2. Der enzymatische LCAT-Assay als Fremdsubstrat-Methode

---

### 4.2.1. Standardisierung des LCAT-Substrates

---

Die mittels der Eigensubstrat-Methode im Serum gemessene LCAT-Aktivität ist abhängig sowohl von der Enzymkonzentration als auch von der Konzentration von LCAT-Substrat, Reaktionsprodukten und Kofaktoren (65,135,147). Die Reaktions-limitierenden Faktoren der Veresterungsaktivität bleiben bei der Eigensubstrat-Methode also unklar.

Untersucht man die LCAT-Aktivität unter standardisierten Substratbedingungen nach Eliminierung der individuellen Lipoproteine, so erhält man ein Bild, das eher die LCAT-Enzym-Konzentrationen an sich und weniger die individuellen Enzym-Substrat-Interaktionen widerspiegelt. Der Wert dieser Fremdsubstrat-Methode zeigt sich bei pathologisch veränderter Lipoprotein-Komposition, was insbesondere die HDL-Fraktion betrifft, die das wesentliche Substrat der LCAT darstellt (2,63).

Die Eliminierung der Lipoproteine aus der Serumprobe wurde sowohl durch Lipoprotein-Präzipitation als auch durch Fraktionierung mittels der Ultrazentrifugentechnik erreicht. Beide Methoden wurden bezüglich ihrer routinemäßigen Anwendbarkeit untersucht.

### 4.2.2. Gewinnung und Definition der delipoproteinisierten Serumfraktion

---

Die LCAT-Aktivitätsmessung nach vollständiger oder partieller Lipoprotein-Präzipitation ist wiederholt beschrieben worden (4,82,97,117). Bartholomé et al. (18) stellte eine Methode vor, die auf der enzymatischen LCAT-Aktivitätsmessung nach vollständiger Lipoprotein-Präzipitation beruhte und als LCAT-Substrat Liposomen aus Phosphatidylcholin und freiem Cholesterin verwendete.

Die Delipoproteinisierung des Serums wurde im Sinne einer Einschnitt-Reaktion in Anlehnung an die Methode von Burstein und Scholnik (31) mittels Natriumphosphorwolframat (1,8%) und Magnesiumchlorid (0,182M) durchgeführt. Im Fällungsüberstand war freies oder verestertes Cholesterin nicht mehr nachweisbar. Die Apolipoprotein A-I-Konzentration wurde um durchschnittlich 43% gesenkt. Die nach Zusatz von Substrat-Liposomen im Überstand gemessene LCAT-Aktivität entsprach bei Normalprobanden in etwa den Meßwerten nicht Dipalmitoyl-Lecithin stimulierter Serumproben.

Geht man von einer engen Bindung der LCAT an das HDL-Substrat aus, so man würde eine deutliche Verminderung der im Fällungsüberstand nachgewiesenen LCAT-Aktivität erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Entweder dissoziiert das LCAT-Enzym im Rahmen der Fällungsreaktion aus dem HDL-Komplex oder man postuliert entsprechend den Untersuchungen von Fielding et al. (52), daß der Überwiegende Teil des LCAT-Enzyms nicht fest an die HDL gebunden ist, sondern in Komplexbindung mit Apolipoprotein A-I und D vorliegt (52,63,99). Die hohen Ionenkonzentrationen bei der Fällungsreaktion führen nach Yamasaki et al. (167) einerseits zu einer Inaktivierung der LCAT, andererseits aber zu einer höheren Bindungsbereitschaft des Enzyms an die HDL. In diesem Sinne sind die hohen Ionenstärken zwar für den raschen Aktivitätsverlust des LCAT-Enzyms nach der Fällung (Aktivitätsverlust von 72% 12 Stunden nach der Präzipitation verantwortlich, nicht aber für eine mögliche Dissoziation des Enzyms aus der postulierten LCAT-HDL-Bindung. Unterstützung findet die Hypothese eines LCAT-Apolipoprotein A-I -Komplexes durch die Tatsache, daß eine Zugabe von Apolipoprotein A-I zum Fällungsüberstand keine weitere LCAT-Aktivitätssteigerung zur Folge hat.

#### 4.2.3. Interferenz der Lipoproteinfällung mit dem enzymatischen LCAT-Assay

-----

Das Problem des Fällungsschrittes besteht darin, daß die im Überstand verbleibenden Konzentrationen von Magnesiumchlorid und Natriumphosphorwolframat ausreichen, um eine sofortige Fällung des zugesetzten Liposomensubstrates zu bewirken. Die äquimolare Zugabe von Natriumcitrat führt nach Bartholome et al (18) zur Komplexierung der Magnesium-Ionen und verhindert auf diese Weise weitere Lipidpräzipitationen. Die nach der Fällung im Überstand verbleibenden Magnesiumchlorid-Konzentrationen sind jedoch je nach Lipoproteingehalt der Probe unterschiedlich. So ist auch die zuzusetzende Menge an Natriumcitrat, die gerade eine Lipidpräzipitation verhindert, von Serumprobe zu Serumprobe verschieden. In vielen Fällen ist die äquimolare Natriumcitratzugabe allein nicht ausreichend. Gerade in diesem Punkt liegt jedoch der Unsicherheitsfaktor der Methode und zwar insofern, als durch steigende Natriumcitrat-Konzentrationen die zur Cholesterin-Bestimmung notwendige Farbreaktion gehemmt wird. Unter Standardbedingungen wird bei der Cholesterin-Bestimmung nach 10 Minuten ein stabiler Extinktionswert erreicht.

Natriumcitrat-Konzentrationen von 0,182 M führen zu Extinktionswerten, die erst nach 40-60 Minuten ein stabiles Plateau erreichen. Die Farbreaktion muß deshalb durch eine Inkubation des Cholesterin-Testansatzes bei 30°C beschleunigt werden. Die auf diese Weise ermittelten Extinktionswerte liegen bei Natriumcitrat enthaltenden Proben niedriger als bei Normalproben. Muß Natriumcitrat in individuell verschiedenen Konzentrationen zum LCAT-Assaymedium hinzugegeben werden, so führt dies einerseits zu einer unterschiedlichen Inhibition der Farbreaktion, andererseits kommt es aufgrund unterschiedlicher Ionenstärken im Assaymedium selbst zu einer entsprechenden Hemmung der LCAT-Reaktion. Höhere Ionenstärken bewirken eine zunehmende Auffaltung des LCAT-Enzyms und damit eine Inaktivierung (167).

Sowohl Magnesiumchlorid als auch Natriumphosphorwolframat hemmen die LCAT-Aktivität. Magnesiumchlorid-Konzentrationen von 0,182 M, wie sie bei der Lipoprotein-Fällung eingesetzt werden, führen zu einer vollständigen Inhibition der LCAT-Aktivität. Natriumphosphorwolframat-Konzentrationen von 1,8% vermindern die Veresterungsrate um 42%. Zu der Hemmung der LCAT-Aktivität durch die Fällungsreagenzien kommt die Hemmung der Farbreaktion durch Natriumcitrat. Sicherlich sind die Konzentrationen dieser Substanzen nach vollständiger Lipoprotein-Fällung bzw. Komplexbildung deutlich niedriger als die initialen Konzentrationen. Die Konzentrationen von  $MgCl_2$  und NaPW variieren jedoch in Abhängigkeit von den individuellen Lipoprotein-Konzentrationen. Entsprechend kommt es zu Interferenzen mit dem LCAT-Assay, die nicht standardisierbar sind und daher die Reproduzierbarkeit der Methode einschränken.

#### 4.2.4. Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen als standardisierbares Substrat der LCAT

Nach erfolgter Delipoproteinisierung des Serums ist die Einbringung eines LCAT-Substrates in das Reaktionsmedium notwendig. Dieses exogen zugeführte Substrat soll den Kriterien der Standardisierbarkeit genügen und optimale Eigenschaften als LCAT-Substrat aufweisen. Bei 56°C hitzeinaktiviertes Serum kann als Fremdsubstrat zwar eingesetzt werden, die mit diesem Substrat erreichten Veresterungsraten sind jedoch relativ niedrig. Ein weiterer Nachteil des hitzeinaktivierten Serums liegt in der mangelnden Standardisierbarkeit (24,100) begründet.

Zur Anwendung kamen daher Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen, die mittels Ultraschallbehandlung (38,76,106) und einem nachfolgenden Reinigungsschritt über Sepharose 6-B hergestellt wurden.

Im Gegensatz zu den aus Dipalmitoyl-Lecithin gewonnenen Liposomen bleiben die aus Dilineoyl-Lecithin und freiem Cholesterin hergestellten Liposomen über 14 Tage stabil und können in diesem Zeitraum ohne weitere Behandlung im LCAT-Assay eingesetzt werden.

Die im Fällungsüberstand meßbare LCAT-Aktivität ist abhängig von dem Phosphatidylcholin/Cholesterin-Verhältnis der synthetischen Liposomen. Die höchsten Veresterungsraten wurden bei einer Cholesterin-Konzentration von 50mg/dl und einem PC/UC Quotienten von 3,8:1 gefunden. Die Literaturangaben zum Thema des optimalen PC/UC-Verhältnis variieren erheblich und reichen von Angaben über 3:1 (101) zu 4:1 (55,97,117) bis zu 20:1 (36). Bartholomé et al.(18) gab einen PC/UC-Quotienten von 3,5:1 an.

Das für die HDL nachgewiesene PC/UC-Verhältnis liegt zwischen 4:1 und 6:1. Daß die HDL das optimale Substrat für die LCAT darstellen, liegt möglicherweise auch in der entsprechenden Lipidkomposition dieser Lipoproteinfraktion begründet. Maximale LCAT-Aktivitäten wurden bei einem Überstand/Liposomen-Verhältnis von 1:1 gemessen. Die LCAT-Reaktion im Überstand war über einen Zeitraum von 60-90 Minuten linear.

Die Linearität der initialen LCAT-Reaktion im delipoproteinisierten Medium war damit deutlich länger als im Vollserum. Die Ursache dieser Linearitätsverlängerung nach Delipoproteinisierung ist unklar. Sowohl bessere Substrateigenschaften der Liposomen als auch eine später einsetzende Produktinhibition können diskutiert werden.

Interessanterweise führt jedoch die Zugabe von Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen zu Vollserum nicht zu der erwarteten Linearitätsverlängerung. Die Tatsache, daß die Liposomen über einen Transferprotein-vermittelten Prozeß Cholesterinester aufnehmen und speichern können, kommt in der initialen Reaktionsphase offenbar nicht zum Tragen (52). Die Beladung der Liposomen mit UC verhindert möglicherweise eine zusätzliche Aufnahme von CE. Die Hypothese besserer Substrateigenschaften der Dilineoyl-Lecithin/Cholesterin-Liposomen findet nur dann Unterstützung, wenn man eine enge Bindung der LCAT an das endogene HDL-Substrat fordert, sodaß die exogen zugeführten Liposomen zunächst gar nicht als LCAT-Substrat fungieren können. Erst die Entfernung der HDL durch die Delipoproteinisierung würde in diesem Sinne eine Interaktion der LCAT mit dem synthetischen Substrat erlauben.

#### 4.2.5. Beurteilung und Indikation der Fremdsubstrat-

##### Methode nach Bartholomé

Der Variationskoeffizient des Fremdsubstrat-Assays lag mit 7,1% relativ hoch ( $n=15$ ,  $MER = 98 \pm 7 \text{ nmol/mlxh}$ ). Ein derartiger Variationskoeffizient kann jedoch unschwer durch eine Steigerung der gleichzeitig durchgeführten Parallelansätze ausgeglichen werden. Das Problem der Methode liegt nicht in der Reproduzierbarkeit von LCAT-Aktivitätsmessungen, sondern zeigt sich in erster Linie in der eingeschränkten Vergleichbarkeit der Meßwerte von Serumproben verschiedener Spender. Wie oben diskutiert, sind die Konzentrationen von Natriumphosphorwolframat, Magnesiumchlorid und entsprechend die Konzentration von nicht komplexiertem Natriumcitrat von Probe zu Probe unterschiedlich, möglicherweise in Abhängigkeit von individuell unterschiedlichen Lipoprotein-Konzentrationen. Die genannten Substanzen hemmen die LCAT-Reaktion und machen so eine exakte Standardisierung des Assays unmöglich. Diese methodisch bedingte, eingeschränkte Standardisierbarkeit des Assays läßt einen routinemäßigen Einsatz der Methode nicht zu. Der Fremdsubstrat-Assay nach Bartholomé (18) eignet sich aber sehr wohl für experimentelle Untersuchungen der LCAT in Lipoprotein-freien Medien. Die Anwendung des Assays in Einzelfällen mit deutlich erniedrigter Veresterungsrate macht eine Unterscheidung zwischen niedrigem Enzymspiegel an sich und/oder pathologisch veränderten Substrateigenschaften möglich.

Die Indikation des Assays besteht deshalb z.B. bei einem Verdacht auf hepatopathisch bedingte, erniedrigte LCAT-Serumkonzentrationen (18,59,71). Eine weitere Indikation stellen ausgeprägte Lipoproteinveränderungen insbesondere der HDL dar, die bei normalen LCAT-Enzymspiegeln zu einer verminderten Veresterungsrate führen können.

#### 4.2.6. LCAT-Aktivität in der $d>1,210\text{g/ml}$ -Fraktion

Die Eliminierung der Serumproteine kann sowohl durch die Lipoprotein-fällung als auch durch die Fraktionierung der Serumprobe mittels der Ultrazentrifugentechnik nach Havel (72) erreicht werden. Wie im oben beschriebenen Fällungs-Überstand kann auch in der  $d>1,210\text{g/ml}$ -Fraktion unabhängig vom physiologischen Lipoproteinsubstrat unter Verwendung synthetischer Liposomen eine Veresterungsaktivität nachgewiesen werden. Die Präparation der  $d>1,210\text{g/ml}$ -Fraktion stellt, verglichen mit der Lipoproteinpräzipitation, ein deutlich aufwendigeres und damit schlechter standardisier-

bares Verfahren dar. Die Messung der LCAT-Aktivität in der  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion blieb deshalb ausschließlich experimentellen Fragestellungen vorbehalten. Das eigentliche Ziel der Untersuchung bestand darin, den Effekt von Apo-HDL oder Apolipoprotein A-I auf die LCAT-Aktivität zu überprüfen. Dazu war ein Assaymedium erforderlich, daß kein endogenes Apolipoprotein A-I aufwies. Eine entsprechende Untersuchung im Überstand nach Lipoprotein-Präzipitation war wegen der unkontrollierbaren Eigenschaft des Überstandes, Lipoproteine auszufällen, nicht auswertbar. Die  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion stellte sich als weitgehend Lipoprotein-freies Medium dar. Cholesterin war mittels enzymatischer Meßmethoden in dieser Fraktion nicht meßbar. Die Lipidelektrophorese erbrachte keinen Nachweis von HDL. Trotz scharfer Schneidetechnik enthielt die  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion Apolipoprotein A-I -Konzentrationen von  $40\text{--}54 \text{ mg/dl}$  (nephelometrische Messung). Dieser Befund korreliert mit den Untersuchungen von A.Børresen (26), die zeigte, daß etwa  $10\text{--}30\%$  des im Serum vorhandenen Apolipoprotein A-I als freies Apolipoprotein nachweisbar sind. Ob es im Rahmen der Ultrazentrifugation zu Apolipoprotein A-I Dissoziationen aus den HDL kommt, ist unklar. Möglicherweise bleibt Apolipoprotein A-I auch wie von Fielding et al. (53) diskutiert als Apolipoprotein A-I, D, LCAT -Komplex in der  $d < 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion.

Die in der  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion gemessene Apolipoprotein A-I-Konzentrationen reichen aus, um eine vollständige LCAT-Aktivierung aufrechtzuerhalten. Weder die Zugabe von gereinigtem Apolipoprotein A-I noch von Apo-HDL hatte einen aktivierenden Effekt auf die Veresterungsrate im Fällungs-Überstand. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Nakagawa et al. (102), der eine zunehmende LCAT-Aktivierung bei steigenden HDL-Konzentrationen in der  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion feststellte und sogar über eine inhibitorische Wirkung höherer HDL-Konzentrationen berichtet. Um die Interferenz endogener Apolipoproteine im LCAT-Assay auszuschalten, schlagen die Autoren Morin und Piran (97) die Verdünnung der Enzymfraktion auf  $1:50$  vor. Bei derartigen Verdünnungsstufen ist die Interferenz des endogenen Apolipoprotein A-I zu vernachlässigen. Allerdings hat die Verdünnung der eingesetzten Enzymfraktion derart niedrige Veresterungsraten zur Folge, daß die Sensitivität der enzymatischen Meßmethode nicht mehr ausreicht. Die LCAT-Aktivitätsbestimmung muß mittels des Radioisotopen-Assays erfolgen.

Auch in der  $d < 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion wurde LCAT-Aktivität nachgewiesen. Die in der  $d < 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion meßbare LCAT-Aktivität lag dabei nur geringfügig niedriger als die in der  $d > 1,210 \text{ g/ml}$ -Fraktion nach Liposomenzugabe erreichte LCAT-

Aktivität. Dieser Befund entspricht den Untersuchungen von Albers et al.(9), der nur  $31 \pm 7\%$  des LCAT-Enzyms in der  $d>1,210$  g/ml-Fraktion wiederfand, jedoch 50% des Enzyms in der Dichtefraktion  $1,063-1,210$ g/ml nachwies. Das Liposomen-substrat, das bei der Untersuchung der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion eingesetzt wurde entsprach in der Zusammensetzung der Liposomenpräparation, die im LCAT-Assay nach Lipoprotein-präzipitation zur Anwendung kam. Sowohl im Fällungsüberstand als auch in der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion wurde ein optimales PC/UC-Verhältnis von  $3,8 : 1,0$  ermittelt. Nakagawa et al. (101) fand die höchste Veresterungsaktivität in der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion bei einem PC/UC-Quotienten von  $3:1$ . Die relativ niedrigen Meßwerte der LCAT-Aktivität in der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion sind z.T. Folge von Enzymverlusten während des Fraktionierungsprozesses. Albers et al. (9) berichtete über LCAT-Enzymverluste bis zu 19% bedingt durch die Präparation der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion. Ein weiterer schlecht standardisierbarer LCAT-Enzymverlust tritt bei der Entsalzung der Serumfraktionen auf. Die bei der Ultrazentrifugation üblichen KBr-Konzentrationen führen zu einer vollständigen LCAT-Inhibition (120). Die enzymatische Bestimmung der Veresterungsaktivität kommt bei den niedrigen Veresterungsraten in der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion in den Grenzbereich ihrer Anwendbarkeit. Aus diesem Grunde wurden Inkubationszeiten von 3 Stunden in Kauf genommen. Das Probe/Farbreakenzverhältnis wurde bei Cholesterin-Konzentrationen unter  $25\text{mg/dl}$  auf  $50\mu\text{l}/500\mu\text{l}$  erhöht. Nur durch eine derartige Sensitivitätssteigerung der Cholesterin-Bestimmung wurde bei verlängerten Inkubationszeiten eine reproduzierbare LCAT-Messung möglich. Die Messung der initialen LCAT-Aktivität in der  $d>1,210$ g/ml-Fraktion bedarf jedoch des Einsatzes der Radioisotopen-Methode.

#### 4.3. Die LCAT-Aktivitätsmessung mit Hilfe des Radioisotopen-Assays; Indikation und Methodenvergleich.

Der Radioisotopen-Assay mißt die LCAT-bedingte Konversion von  $[3\text{H}]$ -Cholesterin zu  $[3\text{H}]$ -Cholesterinestern. Die Indikation dieses Assays ist dann gegeben, wenn bei niedrigen Veresterungsraten die Sensitivität der enzymatischen Methode nicht mehr ausreicht. Eine weitere Indikation stellt die Untersuchung 2-Mercaptoäthanol-stabilisierter LCAT-Enzympräparationen dar, da 2-Mercaptoäthanol die Cholesterinoxidase im enzymatischen Assay hemmt. Verglichen mit dem enzymatischen LCAT-Assay zeichnet sich der Radioisotopen-Assay durch eine deutlich höhere Sensi-

tivität aus. Mittels Kurzzeitinkubationen von 30-60 Minuten können Cholesterin-Umsatzraten im Pikomolbereich sicher bestimmt werden. Im Radioisotopenassay wird primär die fraktionelle Veresterungsrate bestimmt. Um eine entsprechende Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten, müssen die Assay-Bedingungen so gewählt werden, daß eine möglichst hohe fraktionelle Veresterungsrate zur Messung kommt. Dies wird dadurch erreicht, daß die Konzentration des freien Cholesterins im Assay deutlich niedriger gehalten wird als dies etwa in einem enzymatischen Assay (der nur die molare LCAT-Rate mißt) der Fall wäre.

#### 4.4. Reinigung des LCAT-Enzyms

---

Das Ziel der Reinigung des LCAT-Enzyms bestand in der Gewinnung einer Apolipoprotein A-I freien Enzympräparation. Eine vollständige Purifikation des LCAT-Enzyms wurde deshalb nicht angestrebt. Methoden der LCAT-Enzymreinigung sind bisher in großer Zahl beschrieben worden (5,49,62,84,149,150). Allen gemeinsam ist die extrem kurze Halbwertszeit der Enzympräparationen, (wenige Stunden bis Tage). Kitabatake et al. (81) beschrieb dagegen eine Methode, die die Stabilität des gereinigten LCAT-Enzyms für einen Zeitraum von mindestens vier Wochen versprach. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Reinigungsmethodik entspricht im wesentlichen dem von Kitabatake angewandten Verfahren. Apolipoprotein A-I war in der gereinigten Enzymfraktion nephelometrisch nicht mehr nachweisbar. Ohne Zusatz von Apolipoprotein A-I war im LCAT-Assay keine Veresterungsaktivität nachweisbar. Die LCAT-Aktivierung durch gereinigtes Apolipoprotein A-I erfolgte im Rahmen einer Sättigungskinetik und blieb bis zu einer Apolipoprotein A-I Konzentration von 5,7mg/dl (15µg/265µl) im Assay linear.

#### 4.5. Untersuchung der Kofaktor-Eigenschaften von Apolipoprotein A-I Isoformen bei der LCAT-Reaktion

Apolipoprotein A-I stellt sich sowohl in der Ionenaustausch-Chromatographie als auch in der Isoelektrofokussierung als eine heterogene oder polymorphe Substanz dar (45,89). In der Isoelektrofokussierung konnten bis zu sechs Isoformen nachgewiesen werden (57,104,169).

Diese Isoformen zeigen bei unterschiedlichen isoelektrischen Punkten eine ähnliches Molekulargewicht, ähnliche Antigenität, Aminosäurekomposition und Peptidkartierung (104, 165). Die Ursache für die Bildung der Isoformen ist bei gemeinsamen Strukturen (80) unklar.

Im Nüchternblut überwiegen die Isoformen Apolipoprotein A-I-3 und A-I-4. Fettreiche Mahlzeiten führen zu einem Anstieg von Apolipoprotein A-I-1 in der Lymphe (56,28,46,61). Nestruck (104) beschrieb vier Apolipoprotein A-I Isoformen. Die Isoformen AI 1-3 aktivierten die LCAT in gleicher Weise. Apolipoprotein A-I-4 Isoform, die sich von den übrigen Isoformen durch einen zusätzlichen Isoleucin-Rest unterschied, zeigte eine eher inhibitorische Wirkung auf die LCAT-Aktivität. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß es sich bei der Apolipoprotein A-I-4 Isoform um eine Verunreinigung handelte.

Da die Apolipoprotein A-I Isoformen bisher ausschließlich mit der Isoelektrofokussierung nachgewiesen wurden, die angegebene Isoformenzahl je nach Publikation verschieden war, und eindeutige Strukturunterschiede bisher nicht gefunden wurden, drängt sich der Verdacht auf, daß es sich bei dem Isoformenmuster um methodisch bedingte Artefakte handelt. Die vorliegende Untersuchung galt daher dem Versuch einer Definition des Apolipoprotein A-I Musters über das Verfahren der Umkehrphasen-HPLC.

Im Gegensatz zu der Isoelektrofokussierung ergab die Analyse des gereinigten Apolipoprotein A-I mittels der HPLC einen Protein-Hauptpeak sowie zwei kleiner Nebenpeaks. Auch die Vorbehandlung der Apolipoprotein A-I Proben bei saurem oder alkalischem pH führte im Gegensatz zu der Isoelektrofokussierung nicht zu dem erwarteten Isoformenmuster. Da die Ursache für die Heterogenität des Apolipoprotein A-I in der Isoelektrofokussierung nicht eindeutig identifiziert werden konnte, lassen die vorliegenden HPLC-Ergebnisse vermuten, daß die experimentellen Bedingungen der Isoelektrofokussierung für die Bildung des Isoformenmusters zumindest mitverantwortlich sind.

Die LCAT-Aktivierung durch die HPLC-isolierten Apolipoprotein

tein A-I Fraktionen war annähernd gleich und entsprach dem Effekt des nicht fraktionierten, gereinigten Apolipoprotein A-I. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nestruck et al.(104), der die Apolipoprotein A-I Isoformen mittels präparativer Isoelektrofokussierung isolierte und bei den Isoformen A-I 1-3 eine identische LCAT-Aktivierung fand.

Der vorliegende Untersuchungsbefund ist in zweifacher Hinsicht von Bedeutung:

1. Das in der Isoelektrofokussierung produzierbare Isoformenmuster gibt keinen eindeutigen Anhalt für das quantitative Verhältnis der Isoformen. Die Quantifizierung der Isoformen ist mittels der HPLC jedoch möglich und ergibt nur eine wesentliche Apolipoprotein A-I Fraktion, der gegenüber die beiden anderen Fraktionen deutlich in den Hintergrund treten. Dieser Befund reduziert möglicherweise die physiologische Bedeutung des Apolipoprotein A-I Isoformenmusters.

2. Die HPLC-isolierten Apolipoprotein A-I Fraktionen unterschieden sich bezüglich ihrer die LCAT-aktivierenden Wirkung nicht. Dieser Befund unterstützt die Vermutung der physiologischen Irrelevanz des Apolipoprotein A-I Isoformenmusters zumindest in Hinblick auf die Cholesterin-Veresterungsrate.

#### 4.6. Ernährungstudien

---

##### 4.6.1. Begründung der Diätmodifikation und des Studienaufbaus

---

Obwohl die Untersuchungsdauer, die Zahl der Probanden und die Modifikation des P/S-Quotienten in verschiedenen Studien nicht direkt vergleichbar sind, kommt es offenbar schon nach mäßiger Steigerung P/S-Quotienten zu einem Abfall des LDL-Cholesterins (74,131,148). In einer Anzahl von Studien war dieser Abfall jedoch begleitet von einer Senkung des HDL-Cholesterins, was einen unveränderten LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin-Quotienten zur Folge hatte (39, 47). Sogar ein Anstieg dieses Quotienten nach Diäten mit hohem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist berichtet worden (14,25,153). Thompson et al. (148) konnte jedoch eine Senkung des LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin-Quotienten unter einer fettmodifizierten Diät zeigen (P/S=1,5, Cholesterin = 300mg/Tag bei 11 Männern über sechs Wochen).

Da in den Studien, in denen es zu einem Anstieg oder zu keiner Änderung des Quotienten aus LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin gekommen war, Diäten mit einem P/S-Quotienten über 1,5 gegeben wurden, kann angenommen werden, daß ein höherer P/S-Quotient ungünstig für die HDL-Cholesterinkonzentration ist.

Bei der Untersuchung des Einflusses fettmodifizierter Diäten auf den Lipid-Metabolismus kommt Langzeiteffekten der Diät eine wesentliche Bedeutung zu. Die Oslo-Studie (74) zeigte bei hyperlipoproteinämischen Patienten einen deutlichen Anstieg des HDL-Cholesterins nach einer 4 Jahre langen Diät mit einem P/S-Quotienten um 1,0. Dieser Effekt konnte in einer weiteren Langzeit-Studie bestätigt werden (76). Ein Vergleich der Männer in Stockholm und Edinburgh ergab, daß die HDL-Cholesterin-Konzentration zusammen mit dem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Serum und im Fettgewebe in Stockholm höher als in Edinburgh war (87).

Der P/S-Quotient erweist sich als entscheidender Faktor für den Einfluß der Diät auf die HDL. Ein P/S-Quotient von 4,0 verursachte eine Reduktion des HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub>-Quotienten um 28% sowie des Serum-Apolipoprotein A -Gehaltes um 21% bedingt durch eine verminderte Synthese-Rate von Apolipoprotein A-I (130). Eine Diät mit höherem Cholesterin-Gehalt und einem erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren erhöhte die Apolipoprotein A-I Konzentration (146), während eine alleinige

Erhöhung des Cholesterin-Gehaltes bei gleichbleibendem P/S-Quotienten die Apolipoprotein A Konzentration nicht wesentlich beeinflusste (126).

Die Apolipoprotein A-I Serum-Konzentrationen sind also im wesentlichen abhängig von dem P/S-Quotienten der Diät und weniger von deren Cholesterin-Gehalt.

Die Formulierung der fettmodifizierten Diät wurde so gestaltet, daß ein LDL-Cholesterin-Abfall auf Grund des erhöhten P/S-Quotienten ( $P/S=1,0$ ) und des erniedrigten Cholesterin-Gehaltes (250-300mg/Tag) zu erwarten war, während ein wesentlicher Abfall des HDL-Cholesterins und des Apolipoprotein A-I bei einem P/S-Quotienten kleiner als 1,5 nicht zu befürchten war. Weiterhin sollte die Diät im Sinne einer nur mäßigen Modifikation das Kriterium einer guten Praktikabilität bewahren.

#### 4.6.2. Diskussion der Ernährungsstudie

---

Tabelle: 1-8;      Abbildungen: 2-5  
(Originalliteratur 77,128,163,165)

Bei der Betrachtung der vorliegenden Ernährungsstudie sind drei Gesichtspunkte hervorzuheben:

1. Die Untersuchung beschränkte sich ausschließlich auf gesunde Probanden. 2. Eine definierte Kontrolldiät wurde mit einer definierten, isokalorischen, fettmodifizierten Diät verglichen. 3. Der Einfluß der diätetischen Intervention wurde im "cross over" an drei verschiedenen Probandenkollektiven untersucht. Dabei wurde zwischen rein weiblichen (Gruppe II) und rein männlichen (Gruppe I) Probanden unterschieden.

Die Notwendigkeit einer derart kontrollierten Studien-Konzeption ergibt sich aus der multifaktoriellen Bedingtheit der verschiedenen Lipidparameter, die schon im unbeeinflussten Probandenkollektiv zu einer nicht unerheblichen Streubreite der Ergebnisse führt. Die Analyse diätinduzierter Lipidmetabolismus-Daten erfolgt daher mit gebotener Vorsicht und muß in vielen Punkten hypothetisch bleiben..

Die Gruppen IFK und II erhielten nach einer dreimonatigen fettmodifizierten Diät eine dreimonatige Kontrolldiät. Abgesehen vom Geschlechtsunterschied waren diese Gruppen also direkt vergleichbar. Die Gruppe IKF dagegen erhielt die fettmodifizierte Diät erst im Anschluß an die Kontrolldiät.

Die Untersuchungsergebnisse der Gruppe IKF haben deshalb ein besonderes Gewicht, weil diese Gruppe erst nach Vorstabilisierung der Lipidparameter durch eine Kontrolldiät die fettmodifizierte Diät erhielt und damit der Einfluß vordiätetischer Nahrungsgewohnheiten weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die folgende Diskussion widmet sich zunächst den Gemeinsamkeiten der Studiengruppen und geht dann auf voneinander abweichende Untersuchungsergebnisse und die entsprechenden Implikationen ein.

Als herausragendes Ergebnis wird betrachtet, daß die molare LCAT-Aktivität sowie die HDL-Konzentrationen unter der fettmodifizierten Diät in allen drei Gruppen unverändert blieben. Dieser Befund ist im Vergleich mit der Literatur als kontrovers zu betrachten.

So fand Wallentin et al. (156) bei Hypercholesterinämie Typ IIa-Patienten unter einer cholesterinarmen, polyensäurereichen Diät zwar eine unveränderte molare LCAT-Aktivität jedoch einen Anstieg des HDL-Cholesterins. Andere Autoren beschreiben einen diätbedingten Abfall von HDL-Cholesterin und molarer LCAT-Rate (60,95,152,159). Dieser Widerspruch findet seine Erklärung in der Tatsache, daß mit Ausnahme der Untersuchungen von Gjone et al. (60) an den vorliegenden

Studien auch hyperlipoproteinämische Patienten beteiligt waren (95,155,156). Zum anderen bleibt in diesen Studien der P/S-Quotient bzw. der Cholesterin-Gehalt der Diät vielfach unklar.

P/S-Quotienten größer als 1,5 bewirken jedoch eine Senkung des HDL-Cholesterins (39,47). Der diätbedingte Abfall der molaren LCAT-Aktivität wurde bisher insbesondere bei hypertriglyzeridämischen Patienten beobachtet und war entsprechend dem Behandlungsziel von einer Senkung der Serum-Triglyzeride begleitet (157). Die hier vorgestellte Studie umgeht diese Unwägbarkeiten durch ausschließliche Untersuchung von gesunden Probanden bei einem P/S-Quotienten von 1,0.

Der allen drei Gruppen gemeinsame Abfall des Serumgesamtcholesterins unter der fettmodifizierten Diät erfolgte in Übereinstimmung mit vorangegangenen Ernährungsstudien (125,130,131) und war bedingt durch einen Abfall des LDL-Cholesterins sowie in geringerem Ausmaß des VLDL-Cholesterins. Entsprechend wurde bei unverändertem HDL-Cholesterin in allen drei Gruppen ein signifikant niedrigerer Quotient aus LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin beobachtet. Das unveresterte Serum-Cholesterin (UC) wurde in allen drei Gruppen erniedrigt gefunden. Analog zu der konstanten molaren Veresterungsrate wurde bei erniedrigten UC-Werten die fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) erhöht gefunden. Die Veränderungen des Cholesterinstoffwechsels finden eine theoretische Grundlage in der Voraussetzung folgender Annahmen:

1. Die Cholesterin-Reduktion von 370mg auf 250mg pro Tag in der fettmodifizierten Diät führt zu einer verminderten Cholesterin-Aufnahme. Die Erhöhung des P/S-Quotienten von 0,3 auf 1,0 induziert eine Steigerung des Cholesterin-Umsatzes. Eine Cholesterin-Umsatzsteigerung führt bei gleichzeitiger Minderung der Cholesterin-Aufnahme zu einer Senkung des Serumgesamtcholesterins.

2. Die Diätmodifikation hat bei unveränderter Kohlenhydrat- und Gesamtkalorien-Zufuhr zumindest keinen direkten Einfluß auf den Serumtriglyzeridstoffwechsel (zutreffend für Gruppe IKF und II). Bei unverändertem VLDL-Katabolismus ist demgemäß eine Konstanz des zu metabolisierenden Oberflächen-Exzess-Materials zu erwarten. Die molare LCAT-Aktivität würde entsprechend einer dominanten Regulation über den Triglyzeridmetabolismus ebenfalls unverändert bleiben.

Man ist also mit zwei bemerkenswerten Phänomenen konfrontiert: 1. der Konstanz der molaren LCAT-Aktivität; 2. der Verminderung des Serum-Gesamtcholesterins bedingt durch die Modifikation von Cholesterin-Aufnahme und -Turnover. Diese Stoffwechselsituation induziert eine Verminderung des prozentualen Anteiles von unverestertem Cholesterin am Serumgesamtcholesterin und damit eine Steigerung des CE/UC-Quotienten.

Aus dieser Konstellation ergeben sich folgende Fragestellungen: Führt die Senkung des UC bei unveränderter molarer

LCAT-Aktivität und konstanter HDL-Konzentration über die zunehmend freien Bindungsstellen am postulierten LCAT-HDL-Komplex zu einem gesteigerten Abzug von UC aus dem Membran-Cholesterin-Pool (19,65,119)? Und kann in diesem Sinne eine Anhebung der FER und des CE/UC-Quotienten als Steigerung des Cholesterin-Umsatzes und damit als therapeutisch anzustrebendes Ziel verstanden werden?

Diese Fragen bleiben zunächst unbeantwortet, nicht zuletzt deshalb, weil der konkrete Stoffwechselweg des durch die LCAT veresterten Cholesterins bisher weitgehend hypothetisch ist. So ist die Bedeutung der Cholesterin-Veresterung für den Cholesterin-Katabolismus und den Netto-Cholesterin-Umsatz ebenso ungeklärt wie die Frage, in welchem Ausmaß die Cholesterinester-Fraktion wieder zum Pool des unveresterten Cholesterins beiträgt.

Die Diätadhärenz der Probanden wurde anhand der Zunahme des Linolsäureanteiles der Cholesterinester unter der fettmodifizierten Diät überprüft und war für alle drei Gruppen annähernd gleich gut. Eine negative Korrelation von Linolsäuregehalt der Cholesterinester und der LCAT-Aktivität konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren (60,166) nicht nachgewiesen werden.

Signifikante Korrelationen zwischen Lipid- bzw. Apolipoproteinfraktionen und molarer LCAT-Aktivität im Verlauf der Ernährungsstudien ergaben sich nicht. So konnte die umstrittene Korrelation von molarer LCAT-Aktivität und UC-Konzentration im Serum nicht bestätigt werden (15,24,84). Die mangelnde Korrelierbarkeit von HDL- und Apolipoprotein A-I Konzentration mit der LCAT-Aktivität ist bekannt (142,156). Obwohl die HDL das wesentliche Substrat der LCAT darstellen, und Apolipoprotein A-I als Kofaktor bei der Cholesterinveresterung auftritt, so stellen die Konzentrationen dieser Parameter im Serum offenbar keine Reaktions-limitierenden Faktoren dar.

Die z.T. differierenden Untersuchungsergebnisse der drei Gruppen liegen begründet in geschlechtsspezifischen Unterschieden des Lipidmetabolismus (9,43,144) sowie unterschiedlichen prädiätetischen Nahrungsgewohnheiten der Probandenkollektive. Gleichzeitig muß auch auf die begrenzte Zahl der Probanden sowie auf den Stichprobencharakter der analysierten Proben hingewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den Kollektiven konnten zwar durch den Vergleich mit der Kontrolldiät gemindert werden, eine vollständige Nivellierung der entsprechenden Befunde wurde jedoch nicht erreicht. So verhielten sich die Triglyzeridspiegel, CE/UC-Quotient und Apolipoprotein-Konzentrationen im Studienverlauf unterschiedlich. Die Ähnlichkeit der Ergebnisse war wider Erwarten in den Gruppen IKF und II am größten.

Die Gruppe IKF zeichnete sich nach der Kontrolldiät durch die höchsten molaren und fraktionellen LCAT-Aktivitätswerte sowie die höchsten Serumtriglyzeridspiegel aus. Im Gegen-

satz zu den anderen Diät-Gruppen kam es unter der fettmodifizierten Diät zu einem Absinken der Serumtriglyzerid-Konzentration um 19,8%. Gleichfalls im Gegensatz zu den anderen Untersuchungs-Gruppen blieben die Veränderungen von UC, CE/UC und FER unter dem Signifikanzniveau. Eine Senkung der Triglyzeridspiegel unter polyensäurereicher Diät wurde von Chait et al. (44) beschrieben. Folgte man der Hypothese einer Regulation der LCAT-Aktivität über den Triglyzerid-Metabolismus, so würde man einen Abfall der molaren LCAT-Aktivität erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall. Der Gruppenvergleich zeigt, daß die Veränderungen von Triglyzerid- und UC-Konzentration sowie der LCAT-Aktivität einem einfachen kausalen Regulationsprinzip nicht untergeordnet werden können.

Im Gegensatz zu den männlichen Probanden der Gruppe I wurde bei den weiblichen Probanden unter der Anhebung des P/S-Quotienten von 0.3 auf 1.0 ein signifikanter Abfall von Apolipoprotein A-I und B beobachtet. Dieser Befund kann in Beziehung gesetzt werden mit den Untersuchungen von Shepherd et al. (130) und Vessby et al. (153), die bei allerdings deutlich höheren P/S-Quotienten (4.0 bzw. 2.0) eine Senkung der Serumapolipoprotein A-I Konzentration feststellten. Ausgehend von ähnlichen Gesamtcholesterinwerten unter der Kontrolldiät zeigten die weiblichen Probanden einen geringeren Abfall des Serumgesamtcholesterins unter der fettmodifizierten Diät. Die Konzentration des veresterten Cholesterins blieb unverändert. Die Senkung des Gesamtcholesterins vollzog sich in dieser Gruppe im wesentlichen über einen Abfall des unveresterten Cholesterins, der im Gruppenvergleich mit 34,3% am höchsten war und einem Anstieg des CE/UC-Quotienten von 61,2% sowie der FER von 46,6% entsprach. Ein einfacher Rückschluß von den hochsignifikanten diätinduzierten Veränderungen des Serum-UC und der FER auf die Cholesterin-Turnoverrate und damit die Senkung des Serumgesamtcholesterins ist bei den weiblichen Probanden nicht möglich.

#### Zusammenfassung:

Die fettmodifizierte Diät führte zu einer deutlichen Verminderung des Serumgesamtcholesterins und ließ gleichzeitig die molare LCAT-Aktivität sowie die HDL-Konzentration unverändert. Eine eindeutige Abhängigkeit der LCAT-Aktivität von spezifischen Veränderungen der untersuchten Lipid- und Lipoproteinparameter konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Die Regulation der LCAT-Aktivität im Serum stellt sich damit als ein komplexer Vorgang dar, der einer monokausalen Analyse nicht zugänglich ist.

Die vorgestellte Diät zeigt trotz einer nur mäßigen Einschränkung des Nahrungscholesterins und einer gleichzeitig mäßigen Anhebung des P/S-Quotienten eine günstige Wirkung auf den Fettstoffwechsel. Die durchaus moderaten Eingriffe in die Diät weisen auf eine gute Praktikabilität hin und lassen eine entsprechend gute Compliance erwarten.

#### 4.6.3. Kinetik der Veränderungen von Lipid -und Lipoproteinparametern sowie der LCAT im Verlauf der Diätstudie II

---

Tabelle: 5;    Abbildung: 3;

Die LCAT-Aktivität bzw. die Lipid -und Lipoproteinparameter veränderten sich im Verlauf der diätetischen Intervention nicht unbedingt homogen oder gleichgerichtet. Man hat es mit einem komplexen System von Regulation und Gegenregulation zu tun. So kam es im 2.Monat der fettmodifizierten Diät zu einem Abfall der Serumtriglyzeride um 16% gegenüber den Vorwerten. Im 3.Monat befanden sich die Serumtriglyzerid-Konzentrationen wieder auf dem ursprünglichen Niveau der Vorwerte. Ein ähnliches Verhalten wurde bei VLDL- Cholesterin und VLDL-Triglyzeriden konstatiert. Auch die fraktionelle Veresterungsrate wurde im 2.Monat um 16% niedriger gefunden und lag im 3.Monat wieder geringfügig über den Vorwerten. Die Unkenntnis regulatorischer und gegenregulatorischer Prozesse bei zu kurzen Studienverläufen oder zu großen zeitlichen Abständen der Messungen können zu u.U. erheblichen Fehlbeurteilungen diätetisch oder medikamentös bedingter Effekte führen. Unter diesem Blickwinkel sind auch die in der Literatur gefundenen kurzfristigen Analysen therapeutischer Diätinterventionen kritisch zu betrachten (37,59).

#### 4.6.4. Die Bedeutung der Kontrolldiät bei der Beurteilung diätetischer Interventionen (Gruppe II)

---

Tabelle: 7,8;    Abbildung: 6;

Der Stellenwert der Nahrungsgewohnheiten vor der diätetischen Intervention wird deutlich beim Vergleich der Vorwerte mit den Meßdaten nach der Kontrolldiät. Abgesehen von den HDL-Cholesterin -und HDL-Triglyzeridwerten lagen die vordiätetischen Meßwerte durchwegs höher als nach der Kontrolldiät. Das Signifikanzniveau wurde dabei von Serumcholesterin, LDL-Cholesterin, LDL-Triglyzeriden, unverestertem Cholesterin, der FER sowie der MER erreicht. Die fettmodifizierte Diät führte in der Gruppe II zu einem Abfall der Triglyzerid -und Cholesterinkonzentrationen, der im Rahmen der Kontrolldiät nur ein deutlich gemäßigtes Spiegelbild fand. Der Quotient aus LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin lag nach der Kontrolldiät um 37,5% niedriger als bei der vordiätetischen Messung. Signifikante

Veränderungen dieses Quotienten im Vergleich der Kontrolldiät mit der fettmodifizierten Diät ergaben sich dagegen nicht. Der z.T. erhebliche Unterschied zwischen vordiätetischen Meßdaten und den Meßwerten nach der Kontrolldiät zeigt, wie unterschiedlich der Ausgangspunkt der Lipidstoffwechselsituation vor Beginn einer Untersuchung sein kann. In Anbetracht dieser Tatsache sind kurzfristige medikamentöse oder diätetische Untersuchungen ohne Vorschaltung einer Kontrolldiät nur von eingeschränkter Aussagekraft.

#### 4.7. Effekt einer $\beta$ -Sitosterin-Therapie auf die LCAT-Aktivität bei Hyperlipoproteinämie Typ II a

Tabelle: 9;

Die Therapie der Hyperlipoproteinämie Typ II a - Patienten mit  $\beta$ -Sitosterin führte zu einem signifikanten Abfall der Serum-Cholesterin-Konzentration. Dieser therapeutische Effekt stimmt überein mit den Ergebnissen anderer Autoren (20,22,23,48,110). Die Tatsache, daß es zwei Monate nach Beginn der  $\beta$ -Sitosterin-Therapie zu einem 12,6% Absinken des Serumgesamtcholesterin-Spiegels kam, kann erklärt werden durch die gute Diätadhärenz der Patienten. Zudem war die von Grundy und Mok (68) empfohlene Dosierung des  $\beta$ -Sitosterins (6g/Tag) relativ niedrig. Bei einer Dosierung von 21,1g/Tag über vier Monate und gleichzeitiger cholesterinarmer, fettmodifizierter Diät wurde ein Absinken des Serumcholesterins um 12,5% erreicht (110). In dieser wie in der von Oster et al. (110) durchgeführten Studie konnten Cholesterin-Normalwerte nicht erreicht werden. Die  $\beta$ -Sitosterin-bedingte Erniedrigung des Serumgesamtcholesterins sowie des LDL-Cholesterins wurde nicht von einer Veränderung der Serumapolipoprotein B - Konzentration begleitet. In Übereinstimmung mit Drexel et al. (44) kann man vermuten, daß  $\beta$ -Sitosterin im wesentlichen Cholesterinreiche Lipoproteine reduziert, die in einem Dichtebereich liegen, der niedriger als der der Apolipoprotein B -reichen LDL ist. In diesen Lipoproteinen steigt das Verhältnis von verestertem zu unverestertem Cholesterin in dem Maße an, wie die Größe und der Triglyzerid-Gehalt abnehmen. Die Abnahme des Cholesterin/Protein-Verhältnisses der LDL bei gleichbleibender Partikelzahl bzw. Apolipoprotein B -Konzentration läßt die antiatherogene Wirkung des  $\beta$ -Sito-

sterins in einem kritischen Licht erscheinen. Sowohl molare als auch fraktionelle Veresterungsrate stiegen unter der  $\beta$ -Sitosterin-Therapie bei gleichbleibendem CE/UC-Quotienten an. Diese Tatsache kann bei sinkenden Serumcholesterin-Konzentrationen mit einem gesteigerten Cholesterin-Turnover erklärt werden. Die erhöhte Veresterungsrate würde zu einer Konzentrationssteigerung des veresterten Cholesterins führen. Bleibt der CE/UC-Quotient gleich, so muß verestertes Cholesterin in verstärktem Maße aus dem Gleichgewicht entfernt werden.

Der unveränderte CE/UC-Quotient könnte als Folge eines sehr effizienten Regulationsmechanismus betrachtet werden, der bei gesteigertem Cholesterin-Turnover das Verhältnis von verestertem zu unverestertem Cholesterin über eine Anhebung der LCAT-Aktivität konstant hält.

Ob eine erhöhte LCAT-Aktivität notwendig einen erhöhten Umsatz des Körpergesamtscholesterins widerspiegelt, bleibt noch zu klären. Unter einer Therapie mit Cholestipol, das wie  $\beta$ -Sitosterin einen deutlichen Anstieg der molaren Veresterungsrate zur Folge hatte, konnte eine Korrelation von Veresterungsrate und Cholesterin-Turnoverrate nachgewiesen werden (37).

Ein Anstieg der LCAT-Aktivität könnte aber ebenso aus einer  $\beta$ -Sitosterin-bedingten Cholesterin-Umverteilung zwischen HDL und anderen Lipoproteinen resultieren.

Ob der Anstieg der Veresterungsrate Folge oder Ursache des erhöhten Cholesterin-Turnovers ist, bleibt noch zu klären.

Ein ähnlicher Anstieg der FER wie unter der Sitosterin-Therapie wurde nach medikamentösem Einsatz von Cholestipol (37,73) sowie von Cholestyramin beobachtet (156). Die molare LCAT-Aktivität fiel allerdings unter der Cholestipol-Therapie ab (73) oder stieg an (37) und blieb unter Cholestyramin unverändert (156). Auch für Clofibrat konnte bei Hypercholesterinämie Typ IIb Patienten ein Abfall der molaren LCAT-Rate beobachtet werden (157). Dabei blieb unter der Cholestyramin- und Cholestipol-Therapie wie auch in der vorliegenden Studie der Serum-Triglyzerid-Spiegel unverändert (95), während es unter Clofibrat zu einem deutlichen Absinken der Serum-Triglyzeride kam. Ein ähnlicher Anstieg der MER wie unter  $\beta$ -Sitosterin wurde nur in einer Therapie-Studie mit Cholestipol (37) beschrieben.

Möglicherweise ist der Anstieg der molaren LCAT-Aktivität unter  $\beta$ -Sitosterin auf eine erhöhte Synthese und Sekretion des Enzyms durch die Leber zurückzuführen (111). Dies wäre u.U. mit dem erniedrigten Cholesterin-Gehalt der Leber in Einklang zu bringen, der nach der  $\beta$ -Sitosterin-Behandlung von Ratten beobachtet wurde (143).

Ein direkter Zusammenhang zwischen LCAT-Aktivität und Triglyzerid-Stoffwechsel läßt sich auf Grund der vorliegenden Studie nicht herstellen. Möglicherweise kommt es zu  $\beta$ -Sitosterin-bedingten Veränderungen im Cholesterin- und Triglyzerid-Stoffwechsel, die einen derartigen Zusammenhang verischen.

Wie in der von Oster et al. (110) durchgeführten Therapie-Studie blieben die HDL-Cholesterin -und Apolipoprotein A-I-Konzentrationen unverändert. Die vorliegende Studie zeigt deutlich, daß die molare LCAT-Aktivität unabhängig ist von den HDL- bzw. den Apolipoprotein A-I Konzentrationen im Serum. So kam es zwei Monate nach Beginn der  $\beta$ -Sitosterin-Therapie bei konstanten HDL -und Apolipoprotein A-I Werten zu einem 22% Anstieg der MER. Nach drei Monaten der  $\beta$ -Sitosterin-Behandlung betrug die Zunahme der MER 60,5%, wohingegen das HDL-Cholesterin um 13,1% sank. Man kann also davon ausgehen, daß Apolipoprotein A-I im Überschuß im Serum vorhanden und damit für die Veresterungsrate nicht limitierend ist.

Die Verlängerung einer Therapie mit  $\beta$ -Sitosterin von zwei Monaten auf drei Monate ist nur eingeschränkt zu empfehlen. So fielen nach einer dreimonatigen Behandlungsdauer die entsprechenden Veränderungen der Cholesterinwerte und der LCAT-Aktivität gegenüber der zwei-monatigen Therapie deutlich pronanzierter aus, waren jedoch begleitet von einem Abfall des HDL-Cholesterins um 13,1%. Gleichzeitig sank allerdings der Quotient aus LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin um 11%, was aus therapeutischer Sicht wiederum begrüßt werden muß.

Die von  $\beta$ -Sitosterin hervorgerufenen Veränderungen der LCAT Aktivität sind sicherlich von mehr als lediglich therapeutischem Interesse, als sie einige der wesentlichsten Fragestellungen des Cholesterin-Stoffwechsels berühren.

Zusammenfassend ist bei signifikant abfallendem Gesamtcholesterin, einer deutlichen Steigerung der LCAT-Aktivität sowie konstanten Apolipoprotein A-I -und HDL-Cholesterin-Spiegeln der positive antiatherogene Effekt einer zwei Monate langen  $\beta$ -Sitosterin-Therapie hervorzuheben.

#### 4.8. Vergleich der LCAT-Aktivität bei männlichen und weiblichen normolipidämischen Probanden

---

Tabelle: 10;

Die molare Veresterungsrate lag bei den männlichen Probanden um 7,9% höher als bei den weiblichen Probanden. Das Signifikanzniveau wurde im Gruppenvergleich jedoch nicht erreicht. Die fraktionelle Veresterungsrate wurde in beiden Probanden-Gruppen annähernd gleich gefunden.

Sutherland et al. (144) berichtete über eine bei Männern höhere fraktionelle LCAT-Rate und fand keinen Unterschied in der molaren Veresterungsrate. Die Untersuchungen von Dobiasova et al. (43) dagegen ergaben, daß bei Männern sowohl fraktionelle als auch molare LCAT-Aktivität höher lagen als bei den Frauen. Eine bei männlichen Probanden signifikant höhere molare Veresterungsrate wurde auch von Patsch et al. (113) nachgewiesen.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die LCAT-Aktivität im Serum nicht von HDL -und Apolipoprotein A-I Konzentrationen abhängt. Obwohl die HDL-Cholesterin-Werte der weiblichen Probanden um 58%, und die Apolipoprotein A-I Konzentrationen um 24% über den entsprechenden Werten der männlichen Probanden lagen, spiegelte sich diese Tatsache nicht in entsprechend unterschiedlichen LCAT-Aktivitätswerten wider.

Die in der vorliegenden Untersuchung bei den Männern gefundene höhere molare Veresterungsrate könnte in Verbindung gebracht werden mit der um 24% höheren Konzentration an unverestertem Cholesterin sowie den in dieser Gruppe ebenfalls höheren Serumtriglyzerid-Spiegeln.

Die Tatsache, daß die weiblichen Probanden trotz einer um 24% niedrigeren Konzentration an unverestertem Cholesterin eine gleichhohe fraktionelle Veresterungsrate aufwiesen, weist zusammen mit den signifikant höheren HDL-Cholesterin-Werten auf die vergleichsweise günstigere Lipidstoffwechsellaage der Frauen hin.

#### 4.9. LCAT-Aktivität bei Hyperlipoproteinämie Typ IIa

---

Tabelle: 11;

Die Hyperlipoproteinämie Typ IIa Patienten zeigten bei signifikant erhöhten Serumgesamtcholesterin-Spiegeln (74%) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um 44% niedrigere molare und eine um 74% niedrigere fraktionelle LCAT-Aktivität auf. Die signifikant erniedrigten Werte der fraktionellen LCAT-Aktivität entsprechen den Untersuchungen von Wallentin et

al. (156,159) und D'Allessandro (11). Dabei entspricht die Minderung der fraktionellen LCAT-Rate dem pathologisch erniedrigten Cholesterin-Turnover (135). Hilfreich beim Verständnis der Stoffwechsel-Situation der Hyperlipoproteinämie Typ IIa ist die Betrachtung des CE/UC-Quotienten. Dieser ist im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Für die Einstellung des CE/UC-Quotienten ist zu einem wesentlichen Teil die LCAT verantwortlich. Man kann also folgern, daß aus dem Blickwinkel des CE/UC-Quotienten die LCAT-Aktivität ausreichend ist. Die Verminderung der molaren und fraktionellen LCAT-Rate wäre dann als Anpassung an die LDL-Rezeptor-bedingte Minderung des Cholesterin-Turnovers zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

-----

Die vorliegende Arbeit widmete sich der eingehenden Analyse einer problemspezifischen Meßmethodik der LCAT-Aktivität. Verglichen wurden Eigen- und Fremdsubstrat-Methoden sowie enzymatische- und Radioisotopen-Assays. Für klinische Fragestellungen mit großen Probandenzahlen wurde ein enzymatischer Eigensubstrat-Assay auf der Grundlage des von Akanuma et al. (100) vorgestellten Assays charakterisiert und in seiner Anwendbarkeit definiert. Es konnte gezeigt werden, daß der enzymatische Eigensubstrat-Assay in Reproduzierbarkeit und Praktikabilität einem Radioisotopen-Assay überlegen ist. Der enzymatische Fremdsubstrat-Assay nach Batholomé et al. (18), der nach Lipoprotein-Elimination ein definiertes Liposomensubstrat enthält, war aufgrund mangelnder Standardisierbarkeit routinemäßig nicht einsetzbar und blieb deshalb experimentellen Fragestellungen vorbehalten. Für die Untersuchung von LCAT-Enzym-Apolipoprotein A-I Interaktionen wurden Notwendigkeit und Anwendungskriterien eines Radioisotopen-Assays der LCAT-Aktivität dargelegt.

"In vitro" wurde die Regulation des LCAT-Enzyms durch Apolipoprotein A-I unter besonderer Berücksichtigung der Apolipoprotein A-I Subfraktionen untersucht. Der Effekt der mittels HPLC neu charakterisierten Apolipoprotein A-I Subfraktionen auf partiell gereinigte LCAT-Enzympräparationen war annähernd gleich und entsprach der Wirkung des unfraktionierten Apolipoproteins. Diese Ergebnisse können interpretiert werden im Sinne einer geringen physiologischen Relevanz der Apolipoprotein A-I Komposition für die Regulation der LCAT-Aktivität.

"In vivo" wurde die LCAT-Aktivität im Verlauf diätetischer und medikamentöser Interventionen untersucht. Als herausragendes Ergebnis der Diätstudien bei gesunden Probanden wurde eine Senkung des Serumcholesterins bei unveränderter molarer LCAT-Aktivität und gleichfalls unveränderten HDL-Cholesterin-Konzentrationen gefunden. Die bei Hyperlipoproteinämie Typ IIa durchgeführte  $\beta$ -Sitosterin-Therapie führte zu einer Senkung des Serumcholesterins, die bei unverändertem HDL-Cholesterin von einem deutlichen Anstieg der LCAT-Aktivität begleitet war. Die in beiden Studien erreichte Minderung des Serumcholesterins bei konstanter HDL-Cholesterin-Konzentration entsprach der therapeutischen Zielvorstellung. Eine konkrete Korrelation der LCAT-Aktivität mit Serumlipiden oder Lipoproteinen konnte weder in der Diätstudie noch in der  $\beta$ -Sitosterin-Studie festgestellt werden. Die Analyse der in den vorliegenden Studien untersuchten Lipidstoffwechsel-Parameter läßt daher keinen eindeutigen Rückschluß auf die Regulation der LCAT-Aktivität "in vivo" zu.

## 6. Anhang

### 6.1. Tabellen und Abbildungen

#### 6.1.1. Tabellen

Tabelle: 1

#### Diät-Gruppe I FK

n = 10 männliche Probanden. Wilcoxon-Rangtest (Signifikanz Monat 3 gegen Monat 6) \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.005; Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl, fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität (MER) in nmol/ml h, Linolsäuregehalt der Cholesterinester in %.

|                                | fettmodifizierte<br>Diät (Monat 3) | Kontrolldiät<br>(Monat 6) |     |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-----|
| Serumcholesterin               | 185 ± 53                           | 209 ± 47                  | **  |
| Serumtriglyzeride              | 97 ± 53                            | 121 ± 78                  | **  |
| LDL-Cholesterin                | 123 ± 45                           | 135 ± 45                  | **  |
| HDL-Cholesterin                | 41,6 ± 6                           | 43 ± 8                    |     |
| Verestertes Cholesterin (CE)   | 145 ± 43                           | 163 ± 31                  | **  |
| Unverestertes Cholesterin (UC) | 41,0 ± 15,8                        | 46,3 ± 17,2               |     |
| Molare LCAT-Rate (MER)         | 173 ± 48                           | 166 ± 22                  |     |
| Fraktionelle LCAT-Rate (FER)   | 17,9 ± 7,5                         | 16,3 ± 7,8                |     |
| CE / UC                        | 3,7 ± 0,8                          | 3,9 ± 1,2                 |     |
| Linolsäuregehalt der CE        | 63,8 ± 3,9                         | 56,0 ± 3,7                | *** |
| HDL2 - Cholesterin             | 12 ± 3                             | 11 ± 4                    |     |
| HDL3 - Cholesterin             | 29 ± 3                             | 31 ± 5                    |     |
| Serumapolipoprotein A-I        | 147 ± 18                           | 145 ± 23                  |     |
| HDL2-Apolipoprotein A-I        | 21 ± 6                             | 21 ± 9                    |     |
| HDL3-Apolipoprotein A-I        | 97 ± 13                            | 99 ± 18                   |     |
| Serumapolipoprotein A-II       | 44 ± 2                             | 48 ± 3                    |     |
| Serumapolipoprotein B          | 105 ± 24                           | 104 ± 24                  |     |
| Serumapolipoprotein E          | 12,0 ± 3,1                         | 11,9 ± 4,4                |     |
| LDL-Cholesterin                |                                    |                           |     |
| HDL-Cholesterin                | 3,2 ± 3,1                          | 3,6 ± 1,3                 | **  |

Tabelle: 2

Diät-Gruppe I KF

n = 10, männliche Probanden, Wilcoxon-Rangtest (Signifikanz Monat 3 gegen Monat 6) \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005 Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl, fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität (MER) in nmol/ml h, Linolsäureanteil der Cholesterinester in %.

|                                | Kontrolldiät<br>(Monat 3) | fettmodifizierte<br>Diät (Monat 6) |     |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----|
| Serumcholesterin               | 217 ± 35                  | 183 ± 33                           | *** |
| Serumtriglyzeride              | 107 ± 50                  | 99 ± 38                            |     |
| LDL-Cholesterin                | 146 ± 29                  | 118 ± 26                           | *** |
| Verestertes Cholesterin (CE)   | 172 ± 28                  | 150 ± 22                           | *** |
| Unverestertes Cholesterin (UC) | 45,1 ± 10,7               | 33,5 ± 11,5                        | *   |
| Molare LCAT-Rate (MER)         | 113 ± 41                  | 104 ± 28                           |     |
| Fraktionelle LCAT-Rate (FER)   | 11,1 ± 5,4                | 13,9 ± 5,5                         | *   |
| EC / UC                        | 4,0 ± 0,8                 | 4,8 ± 1,1                          |     |
| Linolsäuregehalt der CE        | 53,1 ± 2,6                | 62,1 ± 3,4                         | *** |
| HDL-Cholesterin                | 43 ± 13                   | 45 ± 11                            |     |
| VLDL-Cholesterin               | 25 ± 10                   | 17 ± 7                             | **  |
| VLDL-Triglyzeride              | 81 ± 51                   | 72 ± 42                            |     |
| VLDL-Apolipoprotein B          | 6,4 ± 1,1                 | 6,1 ± 2,1                          |     |
| VLDL-Apolipoprotein A          | 4,7 ± 1,1                 | 3,5 ± 0,9                          | **  |
| HDL2-Cholesterin               | 15 ± 6                    | 14 ± 5                             |     |
| HDL3-Cholesterin               | 29 ± 5                    | 32 ± 6                             |     |
| Serumapolipoprotein A-I        | 140 ± 16                  | 142 ± 22                           |     |
| HDL2-Apolipoprotein A-I        | 25 ± 7                    | 24 ± 10                            |     |
| HDL3-Apolipoprotein A-I        | 100 ± 17                  | 96 ± 24                            |     |

Tabelle: 3

Diät-Gruppe I KF

n = 10, männliche Probanden, Wilcoxon-Rangtest (Signifikanz Monat 3 gegen Monat 6) \*p<0.05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0.005  
Mittelwerte (+/-SD) in mg/dl bzw. %/h (FER), nmol/ml h (MER), in % (Linolsäure).

|                          | Kontrolldiät<br>(Monat 3) | fettmodifizierte<br>Diät (Monat 6) |    |
|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|----|
| Serumapolipoprotein A-II | 45 ± 2                    | 48 ± 4                             |    |
| Serumapolipoprotein B    | 111 ± 17                  | 95 ± 16                            |    |
| Serumapolipoprotein E    | 14,1 ± 4,2                | 12,3 ± 3,4                         |    |
| <u>LDL-Cholesterin</u>   |                           |                                    |    |
| HDL-Cholesterin          | 3,5 ± 0,8                 | 2,8 ± 0,8                          | ** |
| Apolipoprotein C         | 72 ± 29,3                 | 76 ± 25,2                          |    |
| <u>Apolipoprotein E</u>  |                           |                                    |    |
| Apolipoprotein C         | 0,3 ± 0,13                | 0,22 ± 0,09                        | ** |
| VLDL-Apolipoprotein E    | 4,7 ± 1,1                 | 3,5 ± 0,9                          | ** |
| <u>Apolipoprotein E3</u> |                           |                                    |    |
| Apolipoprotein E2        | 2,01 ± 0,68               | 2,54 ± 0,94                        | ** |

Tabelle 4

Diät-Gruppe II

n = 10, weibliche Probanden; Wilcoxon-Rangtest (Signifikanz Monat 3 gegen Monat 6): \*p<0,05; \*\*p<0,025; \*\*\*p<0,01; Mittelwerte (+/-SD) in mg/dl: bzw. %/h (FER), nmol/ml h (MER), % (Linolsäuregehalt der CE).

|                                | fettmodifizierte<br>Diät (Monat 3) | Kontrolldiät<br>(Monat 6) |    |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------|----|
| Serumcholesterin               | 187 ± 36                           | 197 ± 45                  | *  |
| Serumtriglyzeride              | 87 ± 35                            | 81 ± 32                   |    |
| Serumapolipoprotein A-I        | 148 ± 15                           | 178 ± 22                  | ** |
| Serumapolipoprotein A-II       | 46 ± 3                             | 47 ± 6                    |    |
| Serumapolipoprotein B          | 86 ± 14                            | 105 ± 13                  | ** |
| VLDL-Cholesterin               | 10 ± 7                             | 9 ± 8                     |    |
| VLDL-Triglyzeride              | 45 ± 27                            | 40 ± 26                   |    |
| LDL-Cholesterin                | 121 ± 33                           | 133 ± 37                  | *  |
| LDL-Triglyzeride               | 24 ± 7                             | 23 ± 4                    |    |
| HDL-Cholesterin                | 60 ± 14                            | 68 ± 14                   |    |
| HDL-Triglyzeride               | 16 ± 3                             | 20 ± 6                    |    |
| Molare LCAT-Rate (MER)         | 121 ± 38                           | 129 ± 22                  |    |
| Fraktionelle LCAT-Rate (FER)   | 19,5 ± 6,3                         | 13,3 ± 2,8                | *  |
| Unverestertes Cholesterin (UC) | 23 ± 10                            | 35 ± 12                   | *  |
| Verestertes Cholesterin (CE)   | 164 ± 27                           | 162 ± 34                  |    |
| CE / UC                        | 7,04 ± 2,9                         | 4,77 ± 3,3                | *  |
| <u>LDL-Cholesterin</u>         |                                    |                           |    |
| <u>HDL-Cholesterin</u>         | 2,1 ± 0,8                          | 2,0 ± 0,8                 |    |
| Linolsäureanteil der CE        | 64,5 ± 2,9                         | 55,0 ± 2,0                |    |

Tabelle 5

## Diät-Gruppe II

n = 10; weibliche Probanden;

Wilcoxon-Rangtest (Signifikanz gegen Vorwerte) \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  
 Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl,  
 fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität  
 (MER) in nmol/ml h. CE = verestertes, UC = unverestertes Chole-  
 sterin.

## Fettmodifizierte Diät Kontrolldiät

|                           | Vorwerte       | 2.Monat        | 3.Monat          | 1.Monat        | 2.Monat        | 3.Monat           |     |
|---------------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|-------------------|-----|
| Serumgesamtscholesterin   | 215 $\pm$ 43   | 192 $\pm$ 31   | 187 $\pm$ 36 *   | 203 $\pm$ 40   | 210 $\pm$ 43   | 197 $\pm$ 45 *    | 1   |
| Serumtriglyceride         | 88 $\pm$ 40    | 74 $\pm$ 24    | 87 $\pm$ 35      | 89 $\pm$ 39    | 75 $\pm$ 17    | 81 $\pm$ 32       | 1   |
| VLDL-Cholesterin          | 15 $\pm$ 16    | 4.6 $\pm$ 3.7  | 10.4 $\pm$ 7.0   | 9.7 $\pm$ 7.8  | 7.0 $\pm$ 4.4  | 8.6 $\pm$ 8.0     | 105 |
| VLDL-Triglyceride         | 48 $\pm$ 36    | 33 $\pm$ 18    | 45 $\pm$ 30      | 50 $\pm$ 33    | 36 $\pm$ 11    | 40 $\pm$ 26       | 1   |
| LDL-Cholesterin           | 160 $\pm$ 38   | 126 $\pm$ 30   | 121 $\pm$ 33 **  | 140 $\pm$ 31   | 157 $\pm$ 42   | 133 $\pm$ 35 **   | 1   |
| LDL-Triglyceride          | 32 $\pm$ 7.5   | 24 $\pm$ 8.1   | 24 $\pm$ 6.9 **  | 27 $\pm$ 8.0   | 26 $\pm$ 6.2   | 23 $\pm$ 3.8 *    | 1   |
| HDL-Cholesterin           | 53 $\pm$ 9.5   | 57 $\pm$ 9.6   | 60 $\pm$ 14.1 *  | 62 $\pm$ 12.9  | 64 $\pm$ 10.3  | 68.3 $\pm$ 14 **  | 1   |
| HDL-Triglyceride          | 18.7 $\pm$ 2.3 | 16 $\pm$ 3.7   | 16.3 $\pm$ 2.8   | 18.6 $\pm$ 3.6 | 16.3 $\pm$ 3.0 | 19.9 $\pm$ 5.9    | 1   |
| Unverestertes Cholesterin | 43 $\pm$ 12    | 30 $\pm$ 10    | 23 $\pm$ 10 **   | 31 $\pm$ 11    | 38 $\pm$ 12    | 35 $\pm$ 12 **    | 1   |
| Verestertes Cholesterin   | 173 $\pm$ 35   | 161 $\pm$ 23   | 162 $\pm$ 29     | 173 $\pm$ 32   | 172 $\pm$ 36   | 167 $\pm$ 40      | 1   |
| CE / UC                   | 4.1 $\pm$ 0.4  | 5.7 $\pm$ 1.1  | 7.9 $\pm$ 2.4 ** | 5.9 $\pm$ 1.2  | 4.7 $\pm$ 0.6  | 4.9 $\pm$ 0.9 **  | 1   |
| FER                       | 18.7 $\pm$ 5.1 | 15.8 $\pm$ 5.1 | 19.5 $\pm$ 6.3   | 8.3 $\pm$ 2.5  | 14.1 $\pm$ 2.6 | 13.3 $\pm$ 2.8 ** | 1   |
| MER                       | 218 $\pm$ 50   | 139 $\pm$ 77   | 121 $\pm$ 38 **  | 71 $\pm$ 26    | 146 $\pm$ 29   | 129 $\pm$ 22 **   | 1   |
| LDL-Cholesterin           | 3.2 $\pm$ 1.1  | 2.2 $\pm$ 0.6  | 2.1 $\pm$ 0.8 ** | 2.4 $\pm$ 0.8  | 2.5 $\pm$ 0.5  | 2.0 $\pm$ 0.8 **  | 1   |
| HDL-Cholesterin           |                |                |                  |                |                |                   |     |

Tabelle 6

Prozentuale Veränderungen der LCAT-Aktivität sowie der Lipid- und Lipoproteinparameter unter der fettmodifizierten Diät

Vergleich der fettmodifizierte Diät Monat 3 mit der Kontrolldiät Monat 3. Signifikanztest nach Wilcoxon: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,025$ , \*\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,005$ . (--- bedeutet nicht signifikant bei einer Signifikanzschwelle von  $p < 0,05$ ).

|                               | Diätstudie I FM | Diätstudie I HF | Diätstudie II |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Serumcholesterin              | ↑ 11.5 % ***    | ↑ 15.7 % ****   | ↑ 5.1 % *     |
| Serumtriglyceride             | ↑ 19.8 % ***    | --              | --            |
| LDL-Cholesterin               | ↑ 8.9 % ***     | ↑ 19.2 % ****   | ↑ 9.3 % *     |
| HDL-Cholesterin               | --              | --              | --            |
| Cholesterinester (CE)         | ↑ 11.0 % ***    | ↑ 13.4 % ****   | --            |
| Unverestertes Cholesterin(UC) | --              | ↑ 25.7 % *      | ↑ 34.3 % ***  |
| Molare LCAT-Rate              | --              | --              | --            |
| Fractionelle LCAT-Rate        | ↑ 9.8 %         | ↑ 25.2 % *      | ↑ 46.6 % **   |
| CE / UC                       | --              | ↑ 20 %          | ↑ 61.2 % **** |
| Lipidkoeffizient der CE       | ↑ 13.9 % ****   | ↑ 17 % ****     | ↑ 17.2 % **** |
| Apolipoprotein A-I            | --              | --              | ↑ 16.8 % ***  |
| Apolipoprotein A-II           | --              | --              | --            |
| Apolipoprotein B              | --              | --              | ↑ 18 % ***    |

Tabelle 7

Vergleich der Diätstudien nach 3 Monaten Kontrolldiät

Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl, fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität (MER) in nmol/ml h, Linolsäurehalt der Cholesterinester in %.

|                    | I KF           | I FK           | II             |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Serumcholesterin   | 217 $\pm$ 35   | 209 $\pm$ 47   | 197 $\pm$ 45   |
| Serumtriglyzeride  | 107 $\pm$ 50   | 121 $\pm$ 78   | 81 $\pm$ 32    |
| LDL-Cholesterin    | 146 $\pm$ 29   | 135 $\pm$ 54   | 133 $\pm$ 37   |
| HDL-Cholesterin    | 43 $\pm$ 13    | 43 $\pm$ 8     | 68 $\pm$ 14    |
| Cholesterinester   | 172 $\pm$ 28   | 163 $\pm$ 31   | 162 $\pm$ 34   |
| Unver. Cholesterin | 45 $\pm$ 11    | 46 $\pm$ 17    | 35 $\pm$ 12    |
| MER                | 113 $\pm$ 41   | 166 $\pm$ 22   | 129 $\pm$ 22   |
| FER                | 11,1 $\pm$ 5,4 | 16,0 $\pm$ 7,8 | 13,3 $\pm$ 2,8 |
| CE / UC            | 4,0 $\pm$ 0,8  | 3,9 $\pm$ 1,2  | 4,9 $\pm$ 1,0  |
| Linolsäure (CE)    | 53 $\pm$ 2,6   | 56 $\pm$ 3,7   | 55 $\pm$ 2     |
| Apolipoprot. A-I   | 140 $\pm$ 16   | 147 $\pm$ 18   | 178 $\pm$ 22   |
| Apolipoprot. A-II  | 45 $\pm$ 2     | 48 $\pm$ 3     | 47 $\pm$ 6     |
| Apolipoprot. B     | 111 $\pm$ 17   | 104 $\pm$ 24   | 105 $\pm$ 13   |

Tabelle 8

Vergleich der Diät-Gruppen I FK und II

Wilcoxon-Rangtest: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,025$ , \*\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\*\* $p < 0,001$ .  
(CE = verestertes, UC = unverestertes Cholesterin, FER = fraktionale LCAT-Aktivität, MER = molare LCAT-Aktivität.

|                                         | 10 weibl. Probanden (Nonnen-Studie) |                    | 10 männl. Probanden (Haftina.-Studie) |                      |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------|
|                                         | fett.Diät(Monat3)                   | Kontr.Diät(Monat6) | fett.Diät(Monat3)                     | Kontr.Diät(Monat6)   |
| Gesamt-Cholesterin                      | 187 $\pm$ 36                        | 197 $\pm$ 45 *     | 185 $\pm$ 53                          | 209 $\pm$ 47 ****    |
| verest. Cholesterin                     | 162 $\pm$ 29                        | 167 $\pm$ 40       | 145 $\pm$ 43                          | 162 $\pm$ 34         |
| unver. Cholesterin                      | 23 $\pm$ 10                         | 35 $\pm$ 12 ***    | 41 $\pm$ 16                           | 46 $\pm$ 17          |
| CE/UC                                   | 7.9 $\pm$ 2.4                       | 4.9 $\pm$ 1.0***   | 3.7 $\pm$ 0.8                         | 3.9 $\pm$ 1.2        |
| MER                                     | 121 $\pm$ 38                        | 129 $\pm$ 22       | 173 $\pm$ 48                          | 166 $\pm$ 22         |
| FER                                     | 19.5 $\pm$ 6.3                      | 13.3 $\pm$ 2.8**   | 17.9 $\pm$ 7.5                        | 16.3 $\pm$ 7.8       |
| Linoläuregehalt<br>der Cholesterinester | 64.5 $\pm$ 2.9                      | 55.0 $\pm$ 2.0***  | 63.8 $\pm$ 3.9                        | 56.0 $\pm$ 3.7 ***** |

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,025$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\*\*\* $p < 0,001$

Tabelle 9

Sitosterin-Studie: Effekt von  $\beta$ -Sitosterin auf Serumlipide, Serumapolipoproteine und LCAT-Aktivität

Wilcoxon-Rangtest: Signifikanz Vorwerte gegen Behandlungswerte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl, fraktionale LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität in nmol/ml h.

|                        | Vorwerte      | Behandlungswerte |  | Behandlungswerte |  | Behandlungswerte |  |
|------------------------|---------------|------------------|--|------------------|--|------------------|--|
|                        |               | Monat 1          |  | Monat 2          |  | Monat 3          |  |
| Serumcholesterin       | 356 $\pm$ 46  | 302 $\pm$ 38 *   |  | 311 $\pm$ 33 **  |  | 293 $\pm$ 27 **  |  |
| Serumtriglyceride      | 127 $\pm$ 83  | 103 $\pm$ 53     |  | 142 $\pm$ 96     |  | 120 $\pm$ 66     |  |
| LDL-Cholesterin        | 269 $\pm$ 40  | 228 $\pm$ 37 *   |  | 227 $\pm$ 29 **  |  | 216 $\pm$ 27 **  |  |
| HDL-Cholesterin        | 61 $\pm$ 12   | 51 $\pm$ 11      |  | 56 $\pm$ 9.6     |  | 53 $\pm$ 8.7**   |  |
| Verestertes Cholest.   | 282 $\pm$ 34  | 237 $\pm$ 23     |  | 248 $\pm$ 24     |  | 234 $\pm$ 27 *   |  |
| Unverestertes Cholest. | 74 $\pm$ 16   | 65 $\pm$ 17      |  | 63 $\pm$ 11 *    |  | 59 $\pm$ 11 **   |  |
| CE / UC                | 3.9 $\pm$ 0.7 | 3.9 $\pm$ 0.7    |  | 4.0 $\pm$ 0.5    |  | 4.1 $\pm$ 0.95   |  |
| MER                    | 76 $\pm$ 32   | 68 $\pm$ 30      |  | 93 $\pm$ 42      |  | 122 $\pm$ 48 *   |  |
| FER                    | 3.5 $\pm$ 1.4 | 3.8 $\pm$ 1.7    |  | 5.2 $\pm$ 2.4    |  | 7.2 $\pm$ 3.0**  |  |
| Serum-Apolipoprot. B   | 151 $\pm$ 31  |                  |  | 153 $\pm$ 29     |  |                  |  |
| Serum-Apolipoprot. A-I | 139 $\pm$ 20  |                  |  | 135 $\pm$ 19     |  |                  |  |
| LDL-Cholesterin        | 4.7 $\pm$ 0.9 | 4.8 $\pm$ 1.2    |  | 4.2 $\pm$ 1.1    |  | 4.2 $\pm$ 1.1*   |  |
| HDL-Cholesterin        |               |                  |  |                  |  |                  |  |

Tabelle: 10

Vergleich männlicher und weiblicher normolipidämischer Probanden

Männliche Probanden: n = 20; weibliche Probanden: n = 9; Altersbereich: 22-58 Jahre.

Mittelwerte (+/-SD) der Serumlipide und Apolipoproteine in mg/dl, fraktionelle LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare LCAT-Aktivität (MER) in nmol/ml h, Linolsäuregehalt der Cholesterinester in %.

|                         | männl. Probanden | weibl. Probanden |
|-------------------------|------------------|------------------|
| Serumcholesterin        | 204 $\pm$ 41     | 197 $\pm$ 45     |
| Serumtriglyzeride       | 114 $\pm$ 64     | 81 $\pm$ 32      |
| LDL-Cholesterin         | 141 $\pm$ 37     | 133 $\pm$ 37     |
| HDL-Cholesterin         | 43 $\pm$ 10      | 68 $\pm$ 14      |
| Cholesterinester (CE)   | 160 $\pm$ 33     | 167 $\pm$ 40     |
| Unver. Cholesterin (UC) | 43 $\pm$ 13      | 35 $\pm$ 12      |
| MER                     | 140 $\pm$ 42     | 129 $\pm$ 22     |
| FER                     | 13,6 $\pm$ 7,0   | 13,3 $\pm$ 2,8   |
| CE / UC                 | 3,9 $\pm$ 1,0    | 4,8 $\pm$ 3,3    |
| Apolipoprotein A-I      | 144 $\pm$ 17     | 178 $\pm$ 22     |
| Apolipoprotein A-II     | 47 $\pm$ 4       | 47 $\pm$ 6       |
| Apolipoprotein B        | 108 $\pm$ 20     | 105 $\pm$ 13     |
| Linolsäure (CE)         | 55 $\pm$ 3,2     | 55 $\pm$ 2,0     |
| <u>LDL-Cholesterin</u>  |                  |                  |
| HDL-Cholesterin         | 3,4 $\pm$ 1,1    | 2,1 $\pm$ 0,8    |
| <u>LDL-Cholesterin</u>  |                  |                  |
| Apolipoprotein B        | 1,3 $\pm$ 0,2    | 1,8 $\pm$ 0,3    |

Tabelle 11

Vergleich der Hyperlipoproteinämie Typ II a -Patienten-  
gruppe mit der Kontrollgruppe normolipidämischer Probanden

Mittelwerte (+/-SD) von Serumlipiden und Apolipoproteinen  
in mg/dl, fraktionale LCAT-Aktivität (FER) in %/h, molare  
LCAT-Aktivität MER) in nmol/ml h, Linolsäuregehalt der Cho-  
lesterinesterin % in mg/dl bzw. %/h (FER), nmol/ml h (MER),  
% (Linolsäuregehalt der CE); ( n.b. = nicht bestimmt ).

|                         | Kontrollgruppe | Typ IIa - Patienten |
|-------------------------|----------------|---------------------|
| Serumcholesterin        | 202 $\pm$ 43   | 356 $\pm$ 46        |
| Serumtriglyceride       | 103 $\pm$ 53   | 127 $\pm$ 83        |
| LDL-Cholesterin         | 140 $\pm$ 37   | 269 $\pm$ 40        |
| HDL-Cholesterin         | 51 $\pm$ 16    | 61 $\pm$ 12         |
| Cholesterinester (CE)   | 162 $\pm$ 33   | 282 $\pm$ 34        |
| Unver. Cholesterin (UC) | 42 $\pm$ 14    | 74 $\pm$ 16         |
| MER                     | 136 $\pm$ 37   | 76 $\pm$ 32         |
| FER                     | 13,5 $\pm$ 6   | 3,5 $\pm$ 1,4       |
| CE / UC                 | 4,2 $\pm$ 1,0  | 3,9 $\pm$ 0,7       |
| Apolipoprotein A-I      | 55 $\pm$ 18    | 139 $\pm$ 20        |
| Apolipoprotein A-II     | 47 $\pm$ 19    | n.b.                |
| Apolipoprotein B        | 107 $\pm$ 3,6  | 151 $\pm$ 31        |
| Linolsäure (CE)         | 55 $\pm$ 28    | n.b.                |
| LDL-Cholesterin         | 3,0 $\pm$ 1,2  | 4,7 $\pm$ 0,9       |
| HDL-Cholesterin         |                |                     |

Tabelle 12

## Übersichtstabelle für LCAT-Normwerte

| Autor             | Substrat    | Methode | Inkub.-<br>Zeit | LCAT-Range<br>oder Mittel-<br>wert $\pm$ SD | Proben-<br>zahl | Geschlecht       |
|-------------------|-------------|---------|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|------------------|
| Akenuma           | et al. 1973 | homolog | Isotopen        | 32-60                                       | 20              | Männer           |
| Blomhoff          | 1974        | homolog | Isotopen        | 30-61                                       | 13              | Frauen           |
| Calandra          | et al. 1971 | homolog | Isotopen        | 91-163                                      | 30              | Männer           |
| Miller            | et al. 1973 | homolog | Isotopen        | 39-93                                       | 19              | Männer u. Frauen |
| Simon             | et al. 1970 | homolog | Isotopen        | 46-72                                       | 11              | Männer u. Frauen |
| Rose              | et al. 1976 | autolog | Isotopen        | 53-88                                       | 12              | Männer u. Frauen |
| Akenuma           | et al. 1976 | autolog | GLC             | 15,7-98                                     | 18              | Männer           |
| Marcel            | et al. 1973 | autolog | Enzymatisch     | 89,2-17,3                                   | 63              | Männer u. Frauen |
|                   |             | autolog | GLC             | 49-84                                       | 7               | Frauen           |
| Blomhoff          | 1974        | autolog | GLC             | 44-95                                       | 40              | Männer           |
| Stokke            | et al. 1971 | autolog | GLC             | 44-95                                       | 40              | Männer           |
| Gjone             | et al. 1971 | autolog | Isotopen        | 60                                          | 10              | Männer           |
| Blomhoff          | 1974        | autolog | Isotopen        | 60                                          | 10              | Frauen           |
| Barter            | 1974        | autolog | Isotopen        | 32-68                                       | 30              | Männer           |
| Patech            | et al. 1976 | autolog | Isotopen        | 47-93                                       | 30              | Männer           |
|                   |             | autolog | Isotopen        | 64-14                                       | 18              | Männer           |
|                   |             | autolog | Enzymatisch     | 91-15                                       | 18              | Männer           |
|                   |             | autolog | Enzymatisch     | 62-12                                       | 10              | Frauen           |
| Dieplinger        | et al. 1980 | autolog | Enzymatisch     | 37,5-93,7                                   | 10              | Männer u. Frauen |
| Soloff            | et al. 1973 | autolog | Isotopen        | 51-137                                      | 12              | Männer           |
| Weillentin        | et al. 1975 | autolog | Isotopen        | 56-130                                      | 40              | Männer           |
|                   |             | autolog | Isotopen        | 58-130                                      | 40              | Frauen           |
| Eigene Ergebnisse |             | autolog | Enzymatisch     | 33-257                                      | 54              | Männer u. Frauen |
| "                 |             | autolog | Enzymatisch     | 38-215                                      | 20              | Männer           |
| "                 |             | autolog | Enzymatisch     | 102-165                                     | 9               | Frauen           |

Tabelle 13

## Zusammensetzung von Kontroll- und fettmodifizierter Diät

|                                  | Kontrolldiät | fettmodifizierte Diät |
|----------------------------------|--------------|-----------------------|
| Kalorien/Tag [ kcal ]            | 2500 - 3000  | 2500 - 3000           |
| Protein [ Energie in % ]         | 15           | 15                    |
| pflanzlich                       | 6            | 6                     |
| tierisch                         | 9            | 9                     |
| Fette [ Energie in % ]           | 37           | 37                    |
| gesättigte Fettsäuren            | 50           | 33                    |
| einfach ungesättigte Fettsäuren  | 35           | 33                    |
| mehrfach ungesättigte Fettsäuren | 15           | 33                    |
| P/S - Quotient                   | 0.3          | 1.0                   |
| Kohlenhydrate [ Energie in % ]   | 48           | 48                    |
| Zucker                           | 17           | 17                    |
| Stärke                           | 31           | 31                    |
| Cholesterin [ mg/Tag ]           | 370          | 250                   |
| Faserstoffe [ g/Tag ]            | 11.6         | 11.6                  |

Abbildung 1

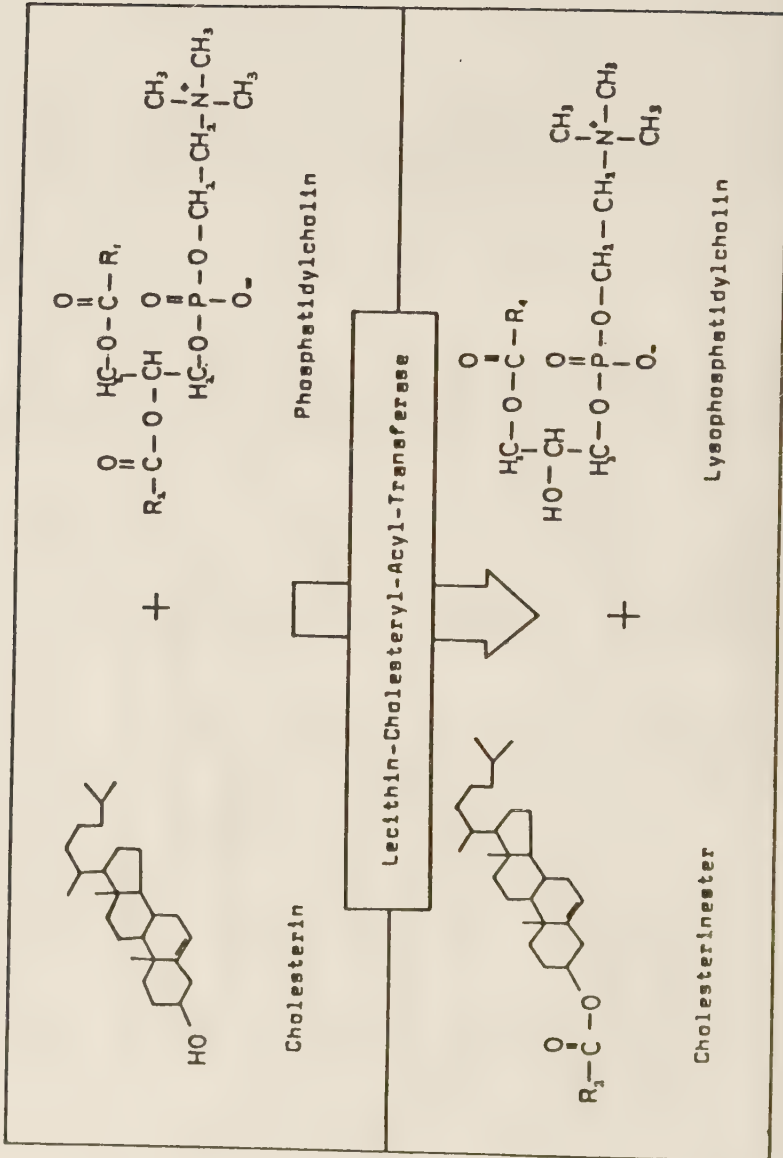


Abbildung 2

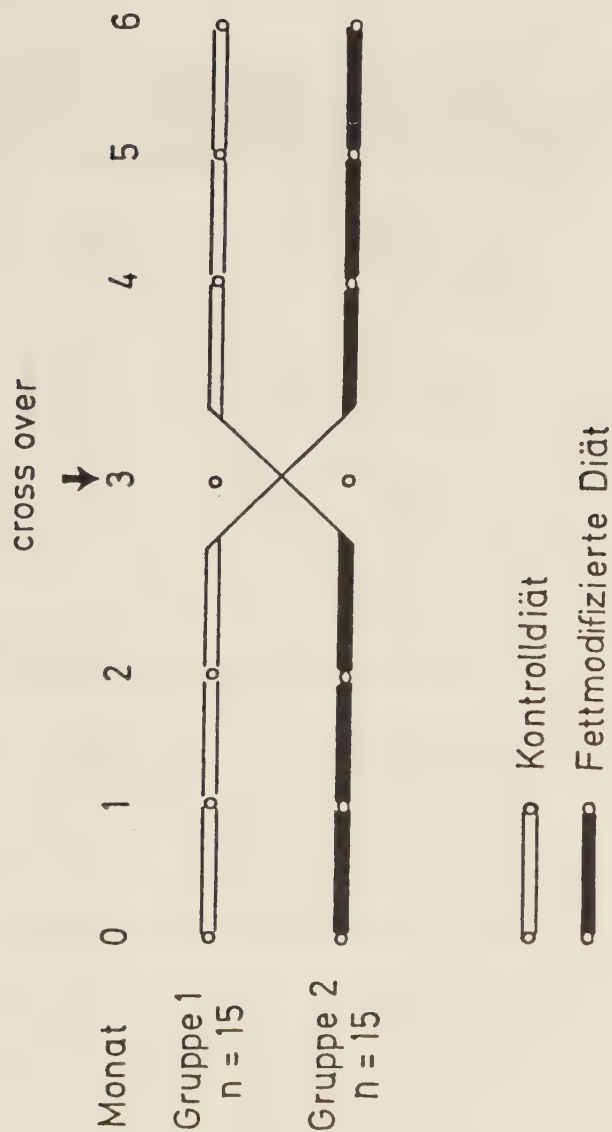


Abbildung 3

Diätstudie II

Veränderungen der Lipidparameter und der LCAT-Aktivität im Verlauf der fettmodifizierten Diät (Monat 1-3) sowie der Kontrolldiät (Monat 1'-3').  
(FER = fraktionale Veresterungsrate; MER = molare Veresterungsrate im Serum)

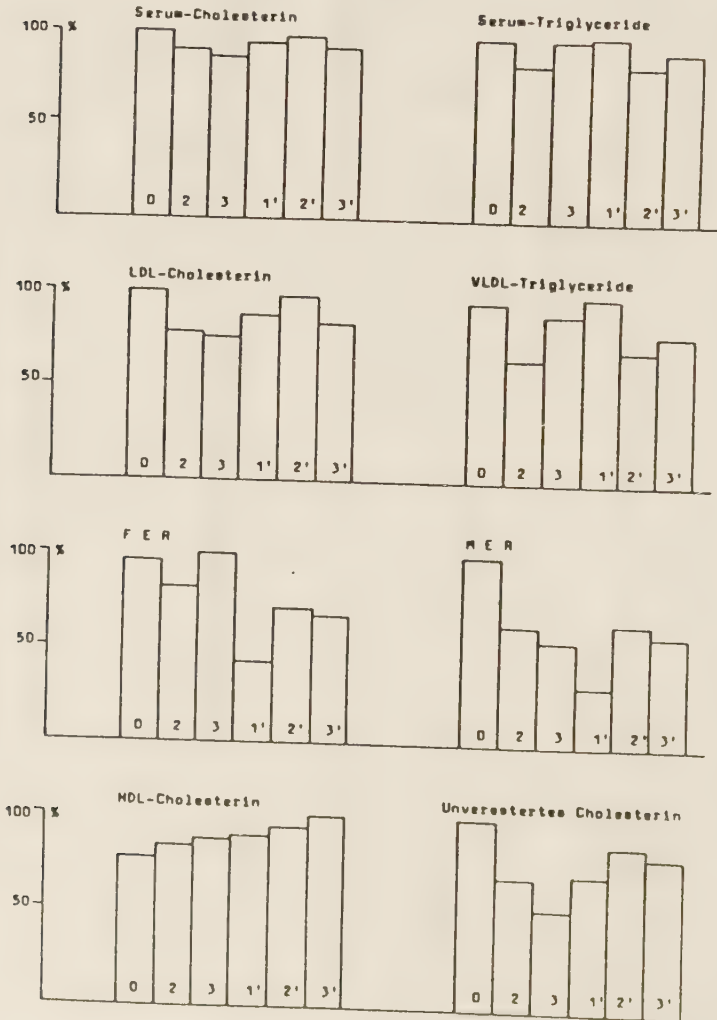


Abbildung 4

Diätstudie II

Vergleich der Lipidparameter und der LCAT-Aktivität vor der diätetischen Intervention (0) sowie nach einer dreimonatigen fettmodifizierten Diät (F3) bzw. einer dreimonatigen Kontrolldiät (K3).

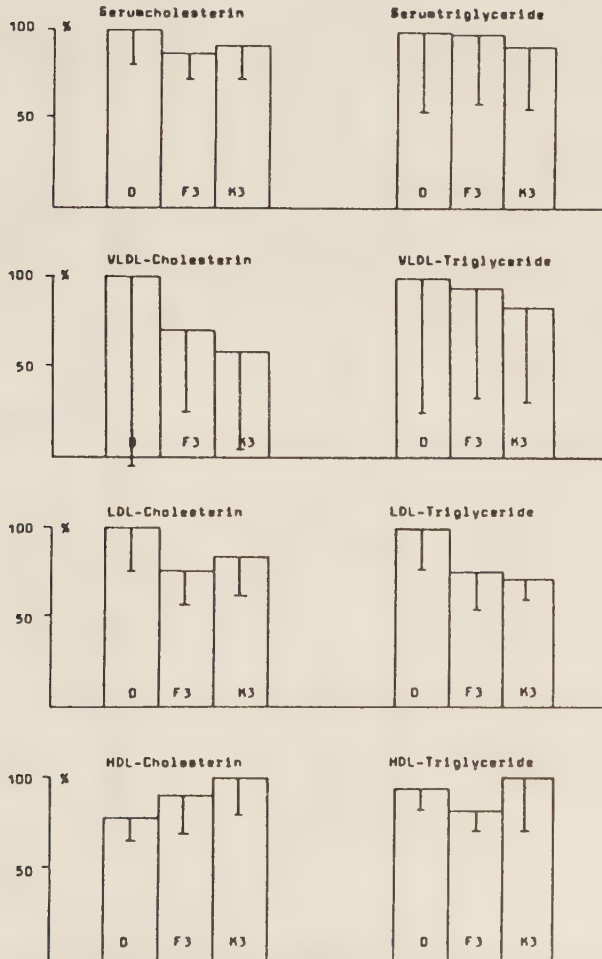


Abbildung 5

Diätstudie II

Vergleich der Lipidparameter und der LCAT-Aktivität vor der diätetischen Intervention (0) sowie drei Monate nach Beginn der fettmodifizierten Diät (F3) bzw. der Kontrolldiät (K3). (FER = fraktionale LCAT-Aktivität; MER = molare LCAT-Aktivität; CE/UC = Quotient aus verestertem zu unverestertem Cholesterin)

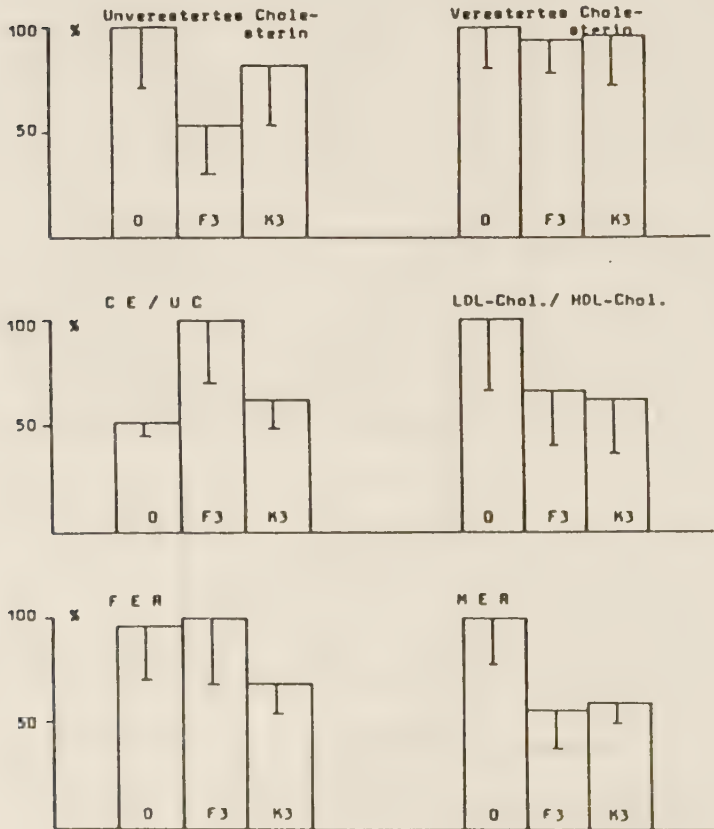
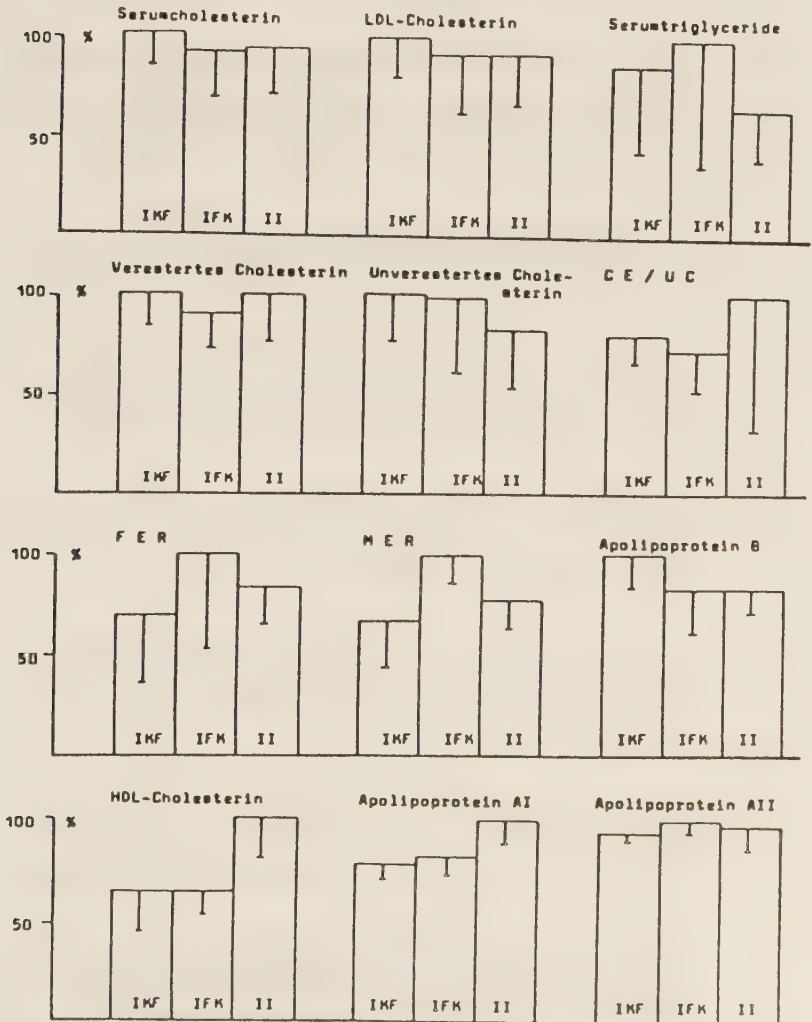


Abbildung 6

Vergleich der Diätgruppen IFK, IKF sowie der Gruppe II nach drei Monaten Kontrolldiät

IFK: männliche Probanden, fettmod. Diät gefolgt von Kontrolldiät; IKF: männliche Probanden, Kontrolldiät gefolgt von fettmodifizierter Diät; II: weibliche Probanden, fettmodifizierte Diät gefolgt von Kontrolldiät. (FER = fraktionelle LCAT-Aktivität, MER = molare LCAT-Aktivität)



## 6.2. Literaturverzeichnis

=====

### 6.2.1. Fremdliteratur

-----

- 1 Y.Akanuma, J.Glomset (1968)  
In vitro incorporation of cholesterol-14C into  
VLDL-cholesteryl-esters  
J.Lip.Res. 9, 620-626
- 2 Y.Akanuma, T.Kuzuya, M.Hyashi, T.Ide, N.Kuzuya  
(1973)  
Positive correlation of LCAT-activity with rela-  
tive body weight  
Eur.J.Clin.Invest. 3, 136-141
- 3 Y.Akanuma, S.Yokoyama, M.Imawari (1978)  
A role of apo-A-I in LCAT-reaction  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 40-47
- 4 L.G.Alkindor, B.Mellin, G.Benhamou, M.C.Piot  
(1977)  
Dosage de la LCAT. Interêt de la précipitation  
des  $\beta$ -lipoproteins par le sulfate de dextrane  
Clin.Chim.Acta 81, 177-182
- 5 J.J.Albers, V.G.Cabana, Y.D.B.Stahl (1976)  
Purification and characterization of human plasma  
LCAT  
Biochemistry 15, 1084-1087
- 6 J.J.Albers, P.W.Wahl, V.G.Cabana, W.R.Hazzard  
(1978)  
High density lipoprotein in myocardial infarction  
survivors  
Metabolism 27, 479-485
- 7 J.J.Albers, (1978)  
Effect of human plasma apolipoproteins on the  
activity of purified LCAT  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 48-52
- 8 J.J.Albers, B.P.Roberts, J.Lin (1979)  
Effect of human plasma apolipoproteins on the acti-  
vity of purified LCAT  
Artery 5, 61-75

- 9 J.J.Albers, C.H.Chen, J.L.Adolphson (1981)  
LCAT-mass, its relationship to LCAT-activity and  
cholesterol esterification rate  
J.Lip.Res. 22, 1206-1213
- 10 J.J.Albers, E.Gjone, J.L.Adolphson, C.H.Chen,  
P.Teisberg, H.Torsvik (1981)  
Familial LCAT-deficiency in four Norwegian families  
Acta Med.Scand. 210, 455-459
- 11 D'Allessandro, A.Zucconi, F.Bellini, L.Boncinelli  
R.Chiofalo (1975)  
LCAT-activity in hypercholesterolemic subjects and  
in hypercholesterolemic subjects treated with Clo-  
fibrate  
Lipids 10, 804-807
- 12 G.Assmann (1978)  
Phosphatidylcholine substrate specificity of LCAT  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 16-20
- 13 G.Assmann, G.Schmitz, H.Heckers (1978)  
The role of HDL in LCAT-activity, perspectives  
from Tangier disease  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 98-102
- 14 J.P.Barter, A.P.Grant (1955)  
The serum cholesterol and other lipids after ad-  
ministration of  $\beta$ -sitosterol  
Brit.Heart J. 17, 296-299
- 15 J.P.Barter (1974)  
Production of plasma esterified cholesterol in  
lean normotriglyceridemic humans  
J.Lip.Res. 14, 234-242
- 16 J.P.Barter, M.E.Jones (1979)  
Rate of exchange of esterified cholesterol  
between human plasma low and high density lipo-  
proteins  
Atherosclerosis 34, 67-74
- 17 J.P.Barter, M.E.Jones (1980)  
Kinetic studies on the transfer of esterified  
cholesterol between human plasma LDL and HDL  
J.Lip.Res. 21, 238-248

- 18 M.Bartholomé, D.Niedman, H.Wieland, D.Seidl (1981)  
An optimized method for measuring LCAT-activity  
independent of concentration and quality of the  
physiological substrate  
Biochim.Biophys.Acta 664, 327-334
- 19 S.R.Bates (1979)  
Cholesterol accumulation in arterial cells and  
extracellular spaces  
Artery 5, 362-378
- 20 K.G.Berge, R.W.Achor, N.W.Barker, N.W.Power (1959)  
Comparison of treatment of hypercholesterolemia  
with nicotinic acid, sitosterol and safflower oil  
Americ. Heart J. 58, 849-853
- 21 M.M.Best, C.H.Duncan, E.J.Van Loon, J.D.Wathen (1954)  
Lowering of serum cholesterol by the administration  
of plant sterol  
Circulation 10, 201-206
- 22 M.M.Best, C.H.Duncan, E.J.VanLoon, J.D.Walters  
(1955)The effects of sitosterol on lipids  
Amer.J.Med. 19, 61-70
- 23 M.M.Best, C.H.Duncan (1956)  
Modification of abnormal serum lipid patterns in  
atherosclerosis by administration of sitosterol  
Ann.Int.Med. 45, 614-622
- 24 J.P.Blomhoff (1974)  
In vitro determination of LCAT in human plasma  
Scand.J.Clin.Lab.Invest.33, Suppl.137, 35-43
- 25 C.B.Blum, R.I.Levy, S.Eisenberg, M.Hall,  
R.H.Goebel, M.Bergmann (1977)  
High density lipoprotein metabolism in man  
J.Clin.Invest. 60, 745-807
- 26 A.L.Børresen, K.Berg (1980)  
Presence of free apo-A-I in serum: Implications  
for immunological quantification of HDL and its  
apoproteins  
Artery 7, 139-160

- 27 B.Borgström (1968)  
Quantitative aspects of the intestinal absorption  
and metabolism of cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol in  
the rat  
J.Lip. Res. 9, 473-481
  
- 28 D.Bojanovski, R.E.Gregg, H.B.Brewer (1984)  
Tangier disease: in vitro conversion of proapo-A-I-  
Tangier to mature apo-A-I-Tangier  
J.Biol.Chem. 259, 6049-6051
  
- 29 W.V.Brown, R.J/Levy, D.S.Fredrickson (1969)  
Studies on the proteins in human plasma very low  
density lipoproteins  
J.Biol.Chem. 244, 5687-5694
  
- 30 M.Burstein, H.R.Scholnik, R.Morfin (1970)  
Rapid method for the isolation of lipoproteins  
from human serum by precipitation with polyanions  
J.Lip. Res. 11, 583-595
  
- 31 M.Burstein, H.R.Scholnik, (1973)  
Lipoprotein-polyanion-metal-interactions  
Adv.Lip. Res. 11, 67-108
  
- 32 A.Chait, A.Onitiri, A.Nicoll, E.Rabaya, J.Davies  
B.Lewis (1974)  
Reduction of serum triglyceride levels by polyun-  
saturated fat  
Atherosclerosis 20, 347-364
  
- 33 T.Chajek, C.J.Fielding (1978)  
Isolation and characterization of human serum  
cholesteryl ester transfer protein  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 3445-3449
  
- 34 T.Chajek, L.Aron, C.J.Fielding (1980)  
Interaction of LCAT and cholesteryl ester transfer  
protein in the transport of cholesteryl ester into  
sphingomyelin liposomes  
Biochemistry 19, 3673-3677
  
- 35 M.K.Chan, L.Randial, Z.Varghese, J.P.Persaud  
R.A.Baillod (1982)  
Plasma LCAT-activities in uremic patients  
Clin.Chim.Acta 119, 65-72

- 36 C.H.Chen, J.J.Albers (1982)  
Characterization of proteioliposomes containing  
apolipoprotein A-I: a new substrate for the  
measurement of LCAT-activity  
J.Lip.Res. 23, 215-226
  
- 37 P.Clifton-Bligh, N.E.Miller, P.J.Nestel (1974)  
Increased LCAT-activity during cholestipol-resin  
therapy in man  
Metabolism 23, 437-444
  
- 38 J.J.Collin, M.C.Phillips (1982)  
The stability and structure of cholesterol-rich  
dispersions of cholesterol and phosphatidylcholine  
J.Lip. Res. 23, 291-298
  
- 39 I.H.Craig, P.J.Phillips, J.V.Lloyd, S.Watts,  
A.Bruckner, R.Read (1980)  
Effects of modified fat diets on the LDL/HDL ratio  
Lancet II, 799
  
- 40 D.G.Cramp, T.R.Tickner (1978)  
The integrative role of LCAT in triglyceride  
clearance  
Scand. J.Clin.Lab.Invest.38, Suppl.150, 115-117
  
- 41 W.Daerr, H.Greten (1982)  
In vitro modulation of the distribution of normal  
human plasma HDL subfractions through the LCAT-  
reaction  
Biochim.Biophys.Acta 710, 128-133
  
- 42 H.Dieplinger, G.Kostner (1980)  
The determination of LCAT in the clinical labora-  
tory: a modified enzymatic procedure  
Clin.Chim.Acta 106, 319-324
  
- 43 M.Dobiasova, K.Vondra (1978)  
LCAT as a possible diagnostic tool in ischemic  
heart disease  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 129-133
  
- 44 H.Drexel, C.Breier, H.J.Lisch, S.Sailer (1981)  
Lowering plasma cholesterol with  $\beta$ -sitosterol  
and diet  
Lancet I, 1157

- 45 C.Edelstein, C.T.Lim, A.M.Scanu (1972)  
On the subunit structure of the protein of human  
serum high density lipoprotein. I a study of its  
major polypeptide component  
J.Biol.Chem. 247, 5842-5849
- 46 C.Edelstein, J.J.Gordon, K.Toskas, H.F.Sims  
A.W.Strauss, A.M.Scanu (1983)  
In vitro conversion of proapoprotein A-I to  
apoprotein A-I  
J.Biol.Chem.258, 11230-11433
- 47 N.Ernst, P.Bowen, M.Fischer, E.J.Schaefer, R.J.Levy  
(1980)  
Changes in plasma lipids and lipoproteins after a  
modified fat diet  
Lancet II, 111-113
- 48 J.W.Farquar, R.E.Smith, M.E.Dempsey (1956)  
The effect of  $\beta$ -sitosterol on the serum lipids  
of young men with atherosclerotic heart disease  
Circulation 14, 77-82
- 49 C.J.Fielding, P.E.Fielding (1971)  
Purification and substrate specificity of LCAT  
from human plasma  
FEBS-Letters 15, 355-358
- 50 C.J.Fielding, V.G.Shore, P.E.Fielding (1972)  
A protein cofactor of LCAT  
Biochim.Biophys.Acta 270, 513-518
- 51 C.J.Fielding (1974)  
Phospholipid-substrate specificity of purified  
human LCAT  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl.137, 15-17
- 52 P.E.Fielding, C.J.Fielding (1980)  
A cholesteryl ester transfer complex in human  
plasma  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 3327-3330
- 53 C.J.Fielding, P.E.Fielding (1981)  
Regulation of human LCAT-activity by lipoprotein  
acceptor cholesteryl ester content  
J.Biol.Chem. 256, 2102-2104

- 54 T.Forte, A.Nichols, J.Glomset (1974)  
The ultrastructure of plasma lipoproteins in  
LCAT-deficiency  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl.137, 121-132
- 55 Y.Furukawa, T.Nishida (1979)  
Stability and properties of lecithin-cholesterol-  
acyl-transferase  
J.Biol.Chem. 254, 7213-7219
- 56 G.Ghiselli, E.J.Schaefer, A.J.Light, H.B.Brewer  
(1983)  
Apolipoprotein A-I isoforms in human lymph:  
effect on fat absorption  
J.Lip.Res. 24, 731-736
- 57 L.I.Gidez, J.B.Swaney, S.Morane (1977)  
Analysis of rat serum apolipoproteins by  
isoelectrofocussing. I. Studies on the middle  
molecular weight subunits  
J.Lip.Res. 18, 59-68
- 58 E.Gjone, K.R.Norum (1968)  
Familial serum-cholesterol ester deficiency  
Acta med.Scand. 183, 107-112
- 59 E.Gjone, J.P.Blomhoff, I.Wiencke (1971)  
Plasma lecithin-cholesterol-acyl-transferase  
in acute hepatitis  
Scand.J.Gastroenterol. 6, 161-168
- 60 E.Gjone, A.Nordoy, J.P.Blomhoff, I.Wiencke (1972)  
The effect of unsaturated and saturated dietary  
fats on plasma cholesterol, phospholipids and  
LCAT-activity  
Acta med.Scand. 191, 481-484
- 61 R.M.Glickmann, P.H.R.Green (1977)  
The intestine as a source of apolipoprotein A-I  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 2569-2575
- 62 J.A.Glomset, J.L.Wright (1964)  
Some properties of a cholesterol esterifying  
enzyme in human plasma  
Biochim.Biophys.Acta 89, 266-276

- 63 J.A.Glomset (1968)  
Role of plasma LCAT in the metabolism of HDL  
J.Lip.Res. 7, 638-648
- 64 J.A.Glomset (1968)  
The plasma LCAT-reaction  
J.Lip.Res. 9, 155-167
- 65 J.A.Glomset (1979)  
Lecithin-cholesteryl-acyl-transferase: an  
exercise in comparative biology  
Progr.biochem.Pharm. 15, 41-66
- 66 J.L.Goldstein, M.S.Brown (1977)  
The LDL-pathway and its relation to athero-  
sclerosis  
Ann.Rev.Biochem. 46, 113-136
- 67 R.G.Gould, R.J.Jones, G.V.Le Roy, R.W.Wissler  
C.B.Taylor (1969)  
Absorbability of  $\beta$ -sitosterol in humans  
Metabolism 18, 652-662
- 68 S.M.Grundy, H.Y.J.Mok (1976)  
Effects of low dose phytosterols on cholesterol  
absorption in man  
In: H.Greten (Ed.)  
Lipoprotein metabolism  
Springer Verlag Berlin, pp 112
- 69 R.L.Hamilton, M.C.Williams, C.J.Fielding,  
R.J.Havel (1976)  
Discoidal bilayer structure of nascent HDL from  
perfused rat liver  
J.Clin.Invest. 58, 667-680
- 70 B.Hamnström, E.Gjone, K.R.Norum (1969)  
Familial LCAT-deficiency  
Brit.Med.J. 2, 283-286
- 71 D.S.Harry, R.C.Day, J.S.Owen, J.Agorastos,  
A.Y.Foo N.Mc.Intyre (1978)  
Plasma LCAT-activity in the lipoprotein abnor-  
malities of liver disease  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 223-227

- 72 R.J.Havel, H.A.Eder, J.H.Bragdon (1955)  
The distribution and chemical composition of  
ultracentrifugally separated lipoproteins in  
human serum  
J.Clin.Invest. 34, 1345-1353
- 73 F.R.Heller, J.P.Desager, C.Harvengt (1981)  
Plasma lipid concentration and LCAT-activity  
in normolipidemic subjects given fenofibrate  
and cholestipol  
Metabolism 30, 67-71
- 74 J.Hjerman, S.C.Enger, A.Helgeland, I.Holme  
P.Leren, K.Trugg (1979)  
The effect of dietary changes on high density  
lipoprotein-cholesterol. The Oslo-study  
Amer.J.Med. 66, 105-109
- 75 W.K.K.Ho, A.V.Nichols (1971)  
Interaction of LCAT with sonicated dispersions  
of lecithin  
Biochim.Biophys.Acta 231, 185-193
- 76 S.B.Hulley, R.Cohen, G.Widdowson (1977)  
Plasma high density lipoprotein cholesterol level.  
Influence of risc factor intervention  
J.Amer.Med.Ass. 238, 2269-2272
- 77 P.Janetschek, V.Heinemann, P.Weisweiler, P.Schwandt  
(1981)  
Effect of a fat-modified diet on the lecithin:  
cholesterol acyltransferase rate  
Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias II  
Eds.: Crepaldi et al. , Academic Press London (1983)  
pp 109-113
- 78 J.P.Kane (1973)  
A rapid electrophoretic technique for identifi-  
cation of subunit species of apoproteins in serum  
lipoproteins  
Analyt.Biochem. 53, 350-364
- 79 J.P.Kane, T.Sata, R.L.Hamilton, R.J.Havel (1975)  
Apoprotein composition of very low density lipo-  
proteins in human serum  
J.Clin.Invest. 56, 1622-1634

- 80 A.Kelley, O'Donnel, A.J.Lusis (1983)  
Genetic evidence that the multiple apolipo-  
protein-isoforms are encoded by a common struc-  
tural gene  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 114, 275-281
- 81 K.Kitabatake, U.Piran, R.Kamio, Y.Doi, T.Nishida  
(1979)  
Purification of human plasam LCAT and its speci-  
fity towards the acyl-receptor  
Biochim.Biophys.Acta 573, 145-154
- 82 G.M.Kostner (1978)  
The influence of various lipoproteins and apo-  
lipoproteins on the "in vitro" esterification of  
cholesterol in human serum by the enzyme LCAT  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl.150, 66-71
- 83 B.J.Kudchodkar, H.S.Sodhi (1976)  
Turnover of plasma cholesteryl ester and its  
relationship to other parameters of lipid meta-  
bolism in man  
Eur.J.Clin.Invest. 6, 285-298
- 84 A.G.Lacko, K.G.Varma, H.L.Ruthenberg, L.A.Soloff  
(1974)  
Studies on enzymatic and molecular properties of  
lecithin: cholesterol acyltransferase  
Scand.J.Clin.Lab.Invest 33, Suppl. 137, 29-34
- 85 C.B.Laurell (1965)  
Antigen-antibody croned electrophoresis  
Analyt.Biochem. 10, 358-361
- 86 A.M.Lees, H.Y.I.Mok, R.S.Lees, M.A. Mc Cleckey  
S.M.Grundy (1977)  
Plant sterols as cholesterol lowering agents:  
clinical trials in patients with hypercho-  
lesterolemia and studies of cholesterol balance  
Atherosclerosis 28, 325-338
- 87 R.L.Logan, M.Thompson, R.A.Riemersma, M.F.Oliver  
A.G.Olsson, S.Rössner, E.Callner, G.Walldius  
L.Kaijser, L.A.Carlson, L.Lockerbie, W.Lutz (1978)  
Risc factors for ischemic heart disease in normal  
men aged fourty  
Lancet I, 949-954

- 88 M.F.Lopes-Virella, P.Stone, S.Ellis, A.Colwell  
(1977)  
Cholesterol determination in high density lipo-  
proteins separated by three different methods  
Clin.Chem. 23, 882-884
- 89 S.E.Lux, R.I.Hirz, R.I.Shrager, A.M.Gotto, (1972)  
The influence of lipid on the conformation of  
human plasma high density apolipoproteins  
J.Biol.Chem. 247, 2598-2606
- 90 B.Maraviglia, F.G.Herring, G.Weeks, D.V.Godin  
(1979)  
Detection of erythrocyte membrane structural  
abnormalities in LCAT-deficiency using a spin  
label approach  
J.Supramol.Structure 11, 1-7
- 91 Y.Marcel, C.Vezina (1973)  
A method for the determination of the initial  
rate of reaction of LCAT in human plasma  
Biochim.Biophys.Acta 306, 497-504
- 92 Y.Marcel, C.Vezina (1974)  
LCAT in human plasma: role of chylomicrons, VLDL,  
and HDL on the reaction  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl. 137, 45-48
- 93 Y,Marcel, C.Vezina, B.Teng, A.Sniderman (1980)  
Transfer of cholesteryl esters between human  
HDL and triglyceride rich lipoproteins controlled  
by a plasma protein factor  
Atherosclerosis 35, 127-133
- 94 J.Mehrnoosh, A.G.Lacko (1982)  
Study of the LCAT-reaction with liposomes and  
high density lipoprotein substrates  
Biochim.Biophys.Acta 713, 504-511
- 95 J.P.Miller, A.Chait, B.Lewis (1975)  
The relationship between dietary fat composition  
and plasma cholesterol esterification in man  
Clin.Sci. and Mol.Med. 49, 617-620

- 96 J.P.Miller (1976)  
LCAT-activity and cholestyramin resin therapy  
in man  
Eur.J.Clin.Invest.6, 477-479
- 97 R.J.Morin, U.Piran (1981)  
A lipoprotein independent assay for human serum  
LCAT  
Clin.Chim.Acta 111, 211-218
- 98 J.D.Morrisett, P.J.Pownall, R.L.Jackson, D.Segura  
A.M.Gotto, O.D.Taunton (1977)  
Effects of polyunsaturated and saturated fat  
diets on the chemical composition and thermotropic  
of human plasma lipoproteins  
In: R.T.Wolman, W.H.Kunan (Eds.)  
Polyunsaturated fatty acids, American Oil Chemi-  
stry Society, Campaign, pp 139-149
- 99 R.E.Morton, D.B.Zilversmith (1981)  
The separation of apolipoprotein D from chole-  
sterylester transfer protein  
Biochim.Biophys.Acta 663, 350-355
- 100 T.Nagasaki, Y.Akanuma (1977)  
A new colorimetric method for the determination  
of plasma LCAT activity  
Clin.Chim.Acta 75, 371-375
- M.Nakagawa, T.Nishida (1972)  
101 Role of HDL in the LCAT-activity with sonicated  
lecithin-cholesterol dispersions as substrate  
Biochim.Biophys.Acta 296, 577-589
- M.Nakagawa, T.Nishida (1973)  
102 Effects of lysolecithin and albumin on lecithin-  
cholesteryl-acyl-transferase-activity in human  
plasma  
J.Biochem.74, 1263-1266
- P.J.Nestel, N.E.Miller, P.Clifton-Bligh (1974)  
103 Plasma cholesterol esterification in vivo in man  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl. 137, 157-159

- 104 A.C.Nestruck, G.Suzue, Y.L.Marcel (1980)  
Studies on the polymorphism of human apolipo-  
protein A-I  
Biochim.Biophys.Acta 617, 110-121
- 105 A.V.Nichols, L.Smith (1965)  
The effect of very-low density lipoproteins  
on lipid transfer in incubated serum  
J.Lip.Res. 6, 206-210
- 106 A.V.Nichols, E.L.Gong (1971)  
Use of sonicated dispersions of mixtures of  
cholesterol with lecithin as substrate for LCAT  
Biochim.Biophys.Acta 231, 175-184
- 107 A.V.Nichols, E.L.Gong, P.J.Blanché (1981)  
Interconversion of high density lipoproteins  
during incubation of human plasma  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 100, 391-399
- 108 G.Nordby, K.Norum (1978)  
Aspects of the role of lecithin: cholesterol  
acyltransferase in metabolism of triglycerides  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 111-114
- 109 K.R.Norum (1974)  
The enzymology of cholesterol esterification  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl. 137, 7-13
- 110 P.Oster, G.Schlier, C.C.Heuck, H.Greten,  
M.Gundert-Remy, W.Haase, G.Klose, A.Nothelfer,  
H.Reatzer, B.Schellenberg, H.Schmidt-Gayk  
Sitosterin bei familiärer Hyperlipoproteinämie  
Typ II a  
Dtsch.Med.Wochenschr. 101, 1308-1311
- 111 T.Osuga, O.W.Portman (1971)  
Origin and disappearance of plasma LCAT  
Amer.J.Phys. 220, 735-741
- 112 V.Papasani, P.V.Subbaiah, C.H.Chen, J.J.Albers  
J.D.Bagdade (1982)  
Studies on the cofactor requirement for the acylation  
and hydrolysis reactions catalyzed by purified lecithin:  
cholesterol acyltransferase  
Atherosclerosis 45, 181-190

- 113 W.Patsch, S.Sailer, H.Braunsteiner (1976)  
An enzymatic method for the determination of the  
initial rate of cholesterol esterification in  
human plasma  
J.Lip.Res. 17, 182-185
- 114 N.M.Pattnaik, A.Montes, L.Barry Hughes, D.B.Zilver-  
smith (1978)  
Cholesteryl ester exchange protein in human plasma.  
Isolation and characterization  
Biochim.Biophys.Acta 530, 428-438
- 115 J.C.Pinon, A.M.Bridoux, M.H.Laudat (1980)  
Initial rate of cholesterol esterification  
associated with HDL in human plasma  
J.Lip.Res. 21, 406-414
- 116 U.Piran, T.Nishida (1976)  
Release of fatty acids from phosphatidylcholine  
by LCAT  
J.Biochem. 80, 887-889
- 117 U.Piran, R.J.Morin (1979)  
A rapid radioassay procedure for plasma LCAT  
J.Lip. Res. 20, 1040-1043
- 118 P.Ranajit, C.S.Ramesha, J.Ganguly (1980)  
On the mechanism of hypocholesterolemic effects  
of polyunsaturated lipids  
Adv.Lip.Res. 17, 155-171
- 119 E.Ray, F.Bellini, G.Stoudt, S.Hemperly, G.Roth-  
blatt (1980)  
Influence of LCAT on cholesterol metabolism in  
hepatoma cells and hepatocytes  
Biochim.Biophys.Acta 617, 318-334
- 120 A.Raz, F.Kummerow, T.Nishida (1969)  
Various factors affecting cholesterol esterifi-  
cation in plasma lipoproteins by LCAT  
Biochim.Biophys.Acta 176, 591-599

- 121 Richmond, (1973)  
Preparation and properties of a cholesteryl  
oxidase from *Nocardia spec.* and its application  
to the enzymatic assay of total cholesterol in  
serum  
*Clin.Chem.* 19, 1350-1354
- 122 P.Röschlau, E.Bernt, W.Gruber (1974)  
Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins  
im Serum  
*Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 12, 403-407
- 123 H.G.Rose J.Juliano (1976)  
Regulation of LCAT in man; I: increased acti-  
vity in primary hypertriglyceridemia  
*J.Lab.Clin.Med.* 88, 29-43
- 124 G.Salen, E.H.Ahrens, S.M.Grundy (1970)  
Metabolism of  $\beta$ -sitosterol in man  
*J.Clin.Invest.* 49, 952-967
- 125 E.J.Schaefer, R.I.Levy, N.D.Ernst, F.D.Van Sant  
H.B.Brewer (1981)  
The effects of low cholesterol, high polyunsatu-  
rated fat and low fat diets on plasma lipids  
and lipoprotein cholesterol levels in normal and  
hypercholesterolemic subjects  
*Amer.J.Clin.Nutr.* 34, 1738-1763
- 126 G.Schonfeld, W.Patsch, L.L.Rudel, C.Nelson,  
M.Epstein, R.E.Olson (1982)  
Effects of dietary cholesterol and fatty acids  
on plasma lipoproteins  
*J.Clin.Invest.* 69, 1072-1080
- 127 P.Schwandt, W.O.Richter (1980)  
Purification of porcine neurophysine I and II  
by high performance liquid chromatography  
*Biochim.Biophys.Acta* 626, 376-382
- 128 P.Schwandt, P.Janetschek, P.Weisweiler (1982)  
High density lipoproteins unaffected by dietary fat  
modification  
*Atherosclerosis* 44, 9-17

- 129 V.N.Schuhmaker, G.H.Adams (1970)  
VLDL-Lipoprotein surface volume changes during  
metabolism  
J.Theoret.Biol.26, 89-91
- 130 J.Shepherd, C.J.Packard, J.R.Patsch, A.M.Gotto  
D.D.Taunton (1978)  
Effect of dietary polyunsaturated and saturated  
fat on the properties of HDL and the metabolism  
of apolipoprotein A-I  
J.Clin.Invest. 61, 1582-1592
- 131 J.Shepherd, J.M.Stuart, J.G.Clark, K.Carr (1980)  
Sequential changes in plasma lipoproteins and  
body fat composition during polyunsaturated fat  
feeding in man  
Brit.J.Nutr. 44, 265-271
- 132 J.B.Simon, J.L.Boyer (1971)  
Production of LCAT by the isolated perfused rat  
liver  
Biochim.Biophys.Acta 218, 549-551
- 133 N.B.Smith, A.Kuksis (1980)  
Stereochemical substrate requirements of LCAT and  
its inhibition by enantiomeric lysolecithins  
Canad.J.Biochem. 58, 1286-1291
- 134 H.S.Sodhi (1974)  
Current concepts of cholesterol metabolism and  
their relationship to LCAT  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl. 137, 161-163
- 135 H.S.Sodhi, J.Kudchodkar, D.T.Mason (1979)  
Cholesterol metabolism in hyperlipidemias  
Adv.Lip.Res. 17, 107-153
- 136 A.K.Soutar, H.J.Pownall, A.S.Hu, L.C.Smith (1974)  
Phase transition in bilamellar vesicles.  
Measurement by pyrene excimer fluorescence and  
effect on transacylation by LCAT  
Biochemistry 13, 2828-2836

- 137      A.K.Soutar, C.W.Garner, H.N.Baker, J.T.Sparrow  
         R.L.Jackson, A.M.Gotto, L.C.Smith (1975)  
         Effect of human plasma apolipoproteins and  
         phosphatidylcholine acyl-donors on the activity  
         of LCAT  
         Biochemistry 14, 3057-3063
- 138      W.M.Sperry (1935)  
         Cholesterol esterase in blood  
         J.Biol.Chem. 111, 467-478
- 139      N.Spritz, M.A.Mishkel (1969)  
         Effects of dietary fats on plasma lipids and  
         lipoproteins: an hypothesis for the lipid-  
         lowering effect of unsaturated fatty acids  
         J.Clin.Invest. 48, 78-86
- 140      K.T.Stokke K.R.Norum (1971)  
         Determination of LCAT in human blood plasma  
         Scand.J.Clin.Lab.Invest. 27, 21-27
- 141      K.T.Stokke, K.S.Bjerve, J.P.Blomhoff (1974)  
         Familial LCAT-deficiency. Studies on lipid  
         composition and morphology of tissues  
         Scand.J.Clin.Lab.Invest. 33, Suppl. 150, 93-100
- 142      K.T.Stokke, S.C.Enger (1976)  
         Plasma HDL-cholesterol and in vitro ester-  
         ification of cholesterol  
         Scand.J.Clin.Lab.Invest. 39, 597-600
- 143      M.Sugano, I.Ikeda, K.Imaizumi, M.Watanabe,  
         M.Andoh (1982)  
         Effect of  $\beta$ -sitosterol on the concentration of  
         serum and liver cholesterol and serum apolipo-  
         proteins in rats fed butter fat  
         J.Nutr.Sci.Vit. 28, 117-126
- 144      W.H.Sutherland, W.A.Temple, E.R.Nye, P.G.Herbison  
         (1979)  
         LCAT-activity in plasma, lipoproteins, lipids and  
         obesity in men and women  
         Atherosclerosis 34, 319-327

- 145 M.Takayama S.Itoh, T.Nagasaki (1977)  
A new enzymatic method for determination of  
serum choline-containing phospholipids  
Clin.Chim.Acta 79, 93-98
- 146 M.H.Tan, M.A.Dickiuson, J.J.Albers, R.J.Havel  
M.C.Cheung, J.L.Vigne (1980)  
The effect of a high cholesterol and saturated  
fat diet on serum HDL-cholesterol, apolipo-  
protein A-I and apolipoprotein E levels in  
normolipidemic humans  
Amer.J.Clin.Nutr. 33, 2559-2565
- 147 S.Thanabalasingham, G.R.Thompson, I.Trayner,  
N.B.Myant, A.K.Soutar (1980)  
Effect of lipoprotein concentration and LCAT-acti-  
vity on cholesterol esterification in human plasma  
after plasma exchange  
Eur.J.Clin.Invest. 10, 45-48
- 148 G.R.Thompson, I.Trayner, W.Danford, F.Mark  
R.Harrison (1980)  
Plasma lipids and lipoproteins after a modified  
fat diet  
Lancet II, 421-422
- 149 G.Utermann, H.J.Menzel, G.Adler, P.Dieker,  
W.Weber (1980)  
Substitution in vitro of LCAT. Analysis of  
changes in plasma lipoproteins  
Eur.J.Biochem. 107. 225-241
- 150 Vaidjanat Mahadevan, L.Soloff (1983)  
A method of isolating human plasma LCAT without  
using antiapolipoprotein-D, and its characteri-  
zation  
Biochim.Biophys.Acta 752, 89-97
- 151 K.G.Varma, A.H.Nowotny, L.A.Soloff (1977)  
Characterization of an antibody to human  
phosphatidylcholine: cholesterol acyl transferase  
Biochim.Biophys.Acta 486, 378-384
- 152 G.L.Vega, E.Groszek, R.Wolf, S.W.Grundy (1982)  
Influence of polyunsaturated fats on composition  
of plasma lipoproteins and apolipoproteins  
J.Lip.Res. 23, 811-822

- 153 B.Vessby, J.Boberg, I.B.Gustavson, B.Karlström  
H.Lithell, A.M.Östlund-Lindquist (1980)  
Reduction of high density lipoprotein cholesterol  
and apolipoprotein A-I concentrations by a lipid  
lowering diet  
Atherosclerosis 35, 21-27
- 154 L.Wallentin, O.Vicrot (1975)  
LCAT in plasma of normal persons in relation to  
lipid and lipoprotein concentration  
J.Clin.Lab.Invest. 35, 669-676
- 155 L.Wallentin (1977)  
LCAT-rate in plasma and its relationship to lipid  
and lipoprotein concentrations in primary hyperli-  
pidemia  
Atherosclerosis 26, 233-248
- 156 L.Wallentin (1978)  
LCAT-rate and HDL in plasma during dietary and  
cholestyramine treatment of hypercholesterolemia  
type IIa  
Eur.J.Clin.Lab.Invest. 8, 383-389
- 157 L.Wallentin (1978)  
LCAT-rate and HDL in plasma during clofibrate  
treatment of hypertriglyceridemic subjects  
Atherosclerosis 31, 41-52
- 158 L.Wallentin, B.Angelin (1978)  
LCAT in plasma and its relation to lipoprotein-  
concentrations and to kinetics of bile acids and  
triglycerides in hyperlipoproteinemic subjects  
Scand.J.Clin.Lab.Invest.38, Suppl. 150, 103-110
- 159 L.Wallentin, L.Moberg (1982)  
LCAT-rate and HDL-level in coronary artery disease  
Atherosclerosis 41, 155-165
- 160 K.Weber, M.Osborn (1969)  
The reliability of molecular weight determina-  
tions by dodecyl sulfate polyacrylamide gel-  
electrophoresis  
J.Biol.Chem. 244, 4406-4412

- 161 P.Weisweiler, B.Sperl, P.Schwandt (1981)  
Determination of HDL: comparison of HDL-cholesterol,  
HDL-phospholipids and HDL-apolipoprotein A-I  
Clin.Chem. 27, 348
- 162 P.Weisweiler, V.Heinemann, W.O.Richter, P.Schwandt  
(1981)  
Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase-Aktivität  
unter einer Behandlung mit  $\beta$ -Sitosterol  
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 87, 998
- 163 P.Weisweiler, M.Drosner, P.Janetschek, P.Schwandt  
(1983)  
Changes in very low and low density lipoproteins  
with dietary fat modification  
Atherosclerosis, 49, 325-332
- 164 P.Weisweiler, V.Heinemann, P.Schwandt (1984)  
Serum lipoproteins and lecithin: cholesterol acyl-  
transferase (LCAT) activity in hypercholesterolemic  
subjects given  $\beta$ -sitosterol  
Int.J.Clin.Pharm., Ther. and Tox. 22, 204-206
- 165 P.Weisweiler, P.Janetschek, P.Schwandt (1985)  
Influence of polyunsaturated fats and fat restric-  
tion on serum lipoproteins in humans  
Metabolism 34, 83-87
- 166 O.Wiklund, A.Gustavson (1979)  
LCAT and fatty acid composition of lecithin and  
cholesteryl esters in young male myocardial in-  
farction survivors  
Atherosclerosis 33, 1-8
- 167 S.Yamasaki, T.Mitsunaga, Y.Furukawa, T.Nishida  
(1983)  
Interaction of LCAT with human plasma lipoproteins  
and with lecithin-cholesterol-vesicles  
J.Biol.Chem.258, 5847-5853
- 168 S.Yokoyama, M.Imawari, H.Itakura (1978)  
A role of apo-A-I in LCAT-reaction  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 38, Suppl. 150, 40-47

- 169 V.I.Zannis, J.S.Breslow, A.J.Katz (1980)  
Isoproteins of human apolipoprotein A-I  
demonstrated in plasma and intestinal organ  
culture  
J.Biol.Chem. 255, 8612-8617
- 170 D.B.Zilversmith, L.B.Hughes, J.Balmer (1975)  
Stimulation of cholesterol ester exchange by  
lipoprotein-free rabbit plasma  
Biochim.Biophys.Acta 409, 393-398

### 6.2.2. Eigene Publikationen

---

- 1 P.Weisweiler, V.Heinemann, W.O.Richter, P.Schwandt (1981)  
Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase-Aktivität unter einer Behandlung mit  $\beta$ -Sitosterol  
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 87, 998
- 2 P.Janetschek, V.Heinemann, P.Weisweiler, P.Schwandt (1983)  
Effect of a fat-modified diet on the lecithin: cholesterol acyltransferase rate  
Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias II  
Eds.: G.Crepaldi et al., Academic Press London (1983) pp 109-113
- 3 P.Weisweiler, V.Heinemann, P.Schwandt (1984)  
Serum lipoproteins and lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in hypercholesterolemic subjects given  $\beta$ -sitosterol  
Int.J.Clin.Pharm., Ther. and Tox. 22, 204-206
- 4 P.Schwandt, W.O.Richter, V.Heinemann, P.Weisweiler (1985)  
Characterization of apolipoprotein A-I by reversed phase high performance liquid chromatography  
J.Chromatography 345, 145-149
- 5 V.Heinemann, U.Jehn (1985)  
Wachstumsfaktoren, eine neue Dimension im Verständnis der Onkogenese  
Klin.Wochenschr. 63, 740-746
- 6 V.Heinemann, U.Jehn (1985)  
Das Bronchialkarzinom: neue zellbiologische Erkenntnisse mit Relevanz für Diagnostik und Therapie  
Internist 26, 521-522
- 7 V.Heinemann, N.Goeldel, U.Jehn (1986)  
Hochdosierte Immunglobulingabe bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura  
Münchener Med.Wochenschr. 128, 361-362

### 6.3. Danksagung

---

Herr Professor Dr.G.Paumgartner ermöglichte mir die wissenschaftliche Arbeit an der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, der Universität München.

Herrn Professor Dr.P.Schwandt danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Die vorliegende Arbeit verdankt ihre Entstehung den umfangreichen zur Verfügung gestellten finanziellen Möglichkeiten sowie der ausgezeichneten Gesamtleistung der Arbeitsgruppe in Hinsicht auf die Entwicklung des Studienaufbaus, die Sicherung der Probenqualität und nicht zuletzt die großzügige Überlassung des gesamten Datenmaterials.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Priv.Doiz.Dr. P.Weisweiler, der zu Aufbau und Durchführung dieser Arbeit durch Rat und Mithilfe einen bedeutenden Teil beigetragen hat.

Herrn Dr.P.Janetschek und Herrn Dr.W.O.Richter sei für die vorbereitenden Arbeiten in der Stoffwechselambulanz sowie für die Apolipoprotein-Fraktionierung gedankt.

Für die freundliche Unterstützung und Mithilfe möchte ich mich bei Frau M.Klebsch, Frau H.Schlaffke, Frau R.Ungar und bei Frau R.Friedel bedanken.

#### 6.4. Lebenslauf

---

Volker Heinemann, geb. am 10.11.1956 in Hilden, als Ältestes von vier Kindern.

Mutter: Gisela Heinemann, geb. Heynen, Diplomdolmetscherin;  
Vater : Gunter Heinemann, Diplomkaufmann. Seit 1961 wohnhaft in München.

#### Schule:

---

1963 - 1968 Volksschule (Josef Dosch-Volksschule in Gauting)

1968 - 1976 Gymnasium (Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting)

25.6.1976 Erlangen der Hochschulreife mit dem Abitur

#### Universität

---

1976 - 1982 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München (12 Semester)

27.1.1983 Erteilung der Approbation

1978 - 1983 Wissenschaftliche Arbeit im Lipidstoffwechsel-Labor (Professor Schwandt, Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern)

1/1984-10/1985 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern unter der Leitung von Professor Wilmanns und Professor Jehn

Seit 10/1985 Project Investigator im Department of Medical Oncology unter der Leitung von Professor Dr.Plunkett am M.D.Anderson Hospital, University of Texas System Cancer Center, Houston, Texas U.S.A.





